



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**CARACTERIZAÇÃO DE FOSFOLÍPIDOS, INCLUINDO PLASMALOGÉNIOS, EM
BIVALVES DA COSTA PORTUGUESA**

Vera Lúcia Almeida Faneca

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

ORIENTADOR

PRESIDENTE

Doutor Rui José Branquinho de Bessa

Doutora Susana Paula Almeida Alves

VOGAIS

Doutora Cristina Maria Riscado Pereira Mateus Alfaia

Doutora Susana Paula Almeida Alves

2016

Lisboa



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**CARACTERIZAÇÃO DE FOSFOLÍPIDOS, INCLUINDO PLASMALOGÉNIOS, EM
BIVALVES DA COSTA PORTUGUESA**

Vera Lúcia Almeida Faneca

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

PRESIDENTE
Doutor Rui José Branquinho de Bessa

VOGAIS
Doutora Cristina Maria Riscado Pereira Mateus Alfaia
Doutora Susana Paula Almeida Alves

ORIENTADOR

Doutora Susana Paula Almeida Alves

2016
Lisboa

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer à Doutora Susana Alves pela orientação prestada, por todo o apoio que me concedeu durante todo o desenvolvimento desta dissertação e claro, no esclarecimento de dúvidas. E, também, pela transmissão de conhecimentos e instrução de práticas laboratoriais, a maioria desconhecidas para mim, mas que me deram imensa satisfação estar naquele ambiente laboratorial. Um muito obrigado, sem ela isto não era possível.

Ao Professor Rui Bessa, foi graças a ele que tive conhecimento deste tema para dissertação e, a qual acabei por me entregar. E, por ter permitido realizar este trabalho no laboratório e pelo financiamento que permitiu a realização das numerosas análises que foram feitas

Ao Sr. António do viveiro MecoMar, que gentilmente me ajudou a adquirir todos os bivalves necessários para a realização desta dissertação, e que se mostrou, deste início, disposto a colaborar e também o interesse que teve em saber o que iria ser estudado.

Às minhas colegas de laboratório, Natália, Mónica e Olinda, pelos bons momentos passados. “Não stresses”. E, também por alguns ensinamentos.

Aos meus pais, por me terem apoiado na decisão de frequentar este mestrado, e pela ajuda prestada.

A todos os meus amigos. Mas, um especial obrigado à Carolina, foi um grande apoio e incentivo para mim; à Rute pela pequena, mas importante, ajuda que me deu e, também, à Leila por me aturar nos meus delírios e nos momentos de mais stress.

A todos estes, e alguém que me tenha esquecido (não é por mal), o meu mais sincero obrigado!

Resumo

Caracterização de fosfolípidos, incluindo plasmalogénios, em bivalves da Costa Portuguesa

Apesar da existência de alguns estudos que envolvem a caracterização lipídica de bivalves, não se conhece a existência de trabalhos que envolvam os bivalves da Costa Portuguesa, nomeadamente no que diz respeito à caracterização lipídica de plasmalogénios.

Os plasmalogénios são fosfolípidos presentes nas membranas celulares que parecem ter relevância no estado de saúde e/ou doença nos humanos, dado as suas funções biológicas.

O objetivo deste trabalho consistiu na caracterização e determinação do perfil lipídico (ácidos gordos e dimetilacetais), em especial de plasmalogénios, de vários bivalves da Costa Portuguesa: ameijoia japonesa (*Ruditapes phillippinarum*), lambujinha (*Scrobicularia plana*), berbigão (*Cerastoderma spp.*), mexilhão (*Mytillus spp.*), ostra (*Crassostera spp.*) e longueirão (*Ensis spp.*). Também pretendeu verificar se estes bivalves seriam uma boa fonte alimentar de plasmalogénios. Além disto, também se determinou fatores de conversão lipídicos para as diferentes frações lipídicas dos bivalves em estudo.

Os resultados deste trabalho demonstraram que a composição em ácidos gordos dos plasmalogénios é variável entre os bivalves estudados, mas em todos eles houve pontos consistentes, nomeadamente a frequência do C16:0 e C18:0 nos ácidos gordos saturados, bem como a de EPA e DHA e o total de ácidos gordos NMI nos ácidos gordos polinsaturados. Relativamente aos dimetilacetais, o mais frequente foi o 18:0. Através da aplicação dos fatores de conversão lipídicos determinados, conseguiu-se determinar o teor de plasmalogénios existentes em 100g de bivalve, verificando-se que o mexilhão foi o bivalve que apresentou maior conteúdo em plasmalogénios (58,6 mg/100g). Contudo, os bivalves estudados mostraram que não são ricos em plasmalogénios.

Palavras chave: bivalves, plasmalogénios, fosfolípidos, ácidos gordos, dimetilacetais, fatores de conversão

Abstract

Phospholipids characterization, including plasmalogens, in bivalves of the Portuguese Coast

Despite the existence of research involving the lipid characterization of bivalves, there are no concerning bivalves of the Portuguese Coast, particularly regarding the lipid characterization of plasmalogens.

Plasmalogens are phospholipids existing in cell membranes, which seem to be relevant to human's health and sickness due to their biological functions.

The goal of this study is to characterize and determine the lipid profile (fatty acids and dimethylacetals, especially plasmalogens) of several bivalves of the Portuguese Coast, namely Japanese carpet shell (*Ruditapes phillipinarum*), peppery furrow shell (*Scrobicularia plana*), cockle (*Cerastoderma spp.*), mussel (*Mytillus spp.*), oyster (*Crassostera spp.*) and razor shell (*Ensis spp.*). This work also intends to verify if they are a good nutritional source of plasmalogens. Furthermore, the lipid conversion factors for the different lipid fractions of bivalves were also determined under this research.

The results showed that the composition of fatty acids of the plasmalogens are variable amongst the researched bivalves. However, all of them had consistent points, namely the frequency of C16:0 and C18:0 in saturated fatty acids as well as EPA and DHA and a total NMI fatty acids in polyunsaturated fatty acids. Regarding dimethylacetals, the most common was 18:0.

Through the application of the determined lipid conversion factors, it was possible to quantify the plasmalogens content in 100g of bivalves. The mussels revealed to have the highest content of plasmalogens (58,6 mg/100g). Nevertheless, this work showed that the researched bivalves are not rich in plasmalogens.

Key-words: bivalves, plasmalogens, phospholipids, fatty acids, dimethylacetal, conversion factors

Índice geral

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Índice de figuras.....	vi
Índice de tabelas.....	vi
Índice de gráficos.....	vii
Abreviaturas e Siglas.....	viii

Capítulo 1: Revisão Bibliográfica

1. Bivalves no sector das pescas e na alimentação.....	1
2. Valor nutricional dos bivalves.....	2
3. Classificação lipídica.....	3
4. Fosfolípidos e plasmalogénios.....	4
5. Composição lipídica dos plasmalogénios nos bivalves.....	5
6. Bivalves, longevidade e composição lipídica das membranas.....	7
7. Importância dos plasmalogénios em humanos.....	9
7.1. Biossíntese de plasmalogénios.....	10
7.2. Funções biológicas dos plasmalogénios.....	11
7.3. Plasmalogénios na doença.....	12
8. Reposição de plasmalogénios nos tecidos a partir da alimentação/suplementação.....	13
9. Análise da composição lipídica em bivalves.....	15
Objetivos.....	18

Capítulo 2: Materiais e Métodos

1. Amostras.....	19
2. Preparação das amostras.....	19
3. Procedimentos analíticos.....	19
3.1. Extração e quantificação de lípidos totais.....	20
3.2. Isolamento de plasmalogénios.....	20
3.3. Separação de classes lipídicas.....	21
3.4. Transesterificação direta.....	22
3.5. Análise por cromatografia gasosa.....	23
4. Quantificação de FAME e DMA.....	24
5. Determinação de fatores de conversão de ácidos gordos e dimetilacetais.....	24

Capítulo 3: Resultados

1. Composição lipídica dos bivalves.....	26
2. Composição de ácidos gordos das classes de fosfolípidos.....	30
3. Composição de ácidos gordos das subclasses de plasmalogénios.....	37
4. Composição de dimetilacetais das subclasses de plasmalogénios.....	44
5. Fatores de conversão de ácidos gordos e dimetilacetais.....	47

Capítulo 4: Discussão dos Resultados

1. Composição lipídica dos bivalves e caracterização de fosfolípidos.....	50
2. Fatores de conversão lipídicos.....	55

Conclusão e Perspetivas Futuras.....	56
Referências Bibliográficas.....	57

Anexos

Anexo I – Localização e mês de captura dos bivalves estudados.....	62
Anexo II – Extração de lípidos de amostras liofilizadas.....	63
Anexo III – Isolamento de plasmalogénios após hidrólise enzimática com fosfolipase A1.....	65
Anexo IV – Separação de classes lipídicas por cromatografia de extração em fase sólida (SPE).....	66
Anexo V – Transesterificação direta.....	68
Anexo VI – Composição lipídica dos bivalves.....	70

Índice de Figuras

Figura 1 – Algumas espécies bivalves da costa portuguesa.....	2
Figura 2 – Estrutura das três subclasses de fosfolípidos de etanolamina.....	4
Figura 3 – Estrutura dos plasmalogénios neutros.....	5
Figura 4 – Biossíntese de plasmalogénios.....	10
Figura 5 – Ação da fosfolipase A2 sobre os plasmalogénios e reação de oxidação dos plasmalogénios.....	11
Figura 6 – Esquema do processo de análise lipídica utilizado.....	19
Figura 7 – Isolamento de plasmalogénios a partir do extrato lipídico.....	21
Figura 8 – Cromatografia de extração em fase sólida.....	22
Figura 9 – Cromatograma parcial dos ácidos gordos referente à fração lipídica total de uma amostra de mexilhão.....	24
Figura 10 – Exemplo da determinação de fatores de conversão lipídicos da plasmeniletanolamina.....	25

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Composição química de bivalves.....	3
Tabela 2 – Composição em plasmalogénios (% do total de fosfolípidos) em várias fontes alimentares.....	6
Tabela 3 – Conteúdo em plasmalogénios em diferentes tecidos humanos.....	9
Tabela 4 – Teor em ácidos gordos totais (mg/g amostra) e composição em ácidos gordos (% do total de ácidos gordos) dos fosfolípidos de colina (PC) – diacil e plasmalogénios.....	32
Tabela 5 – Teor em ácidos gordos totais (mg/g amostra) e composição em ácidos gordos (% do total de ácidos gordos) dos fosfolípidos de etanolamina (PE) – diacil e plasmalogénios.....	34
Tabela 6 – Teor em ácidos gordos totais (mg/g amostra) e composição em ácidos gordos (% do total de ácidos gordos) dos fosfolípidos de serina (PS) – diacil e plasmalogénios.....	36
Tabela 7 – Teor em ácidos gordos totais (mg/g amostra) e composição em ácidos gordos (% do total de ácidos gordos) dos plasmalogénios de colina (PC _{plsm}).....	38
Tabela 8 – Teor em ácidos gordos totais (mg/g amostra) e composição em ácidos gordos (% do total de ácidos gordos) dos plasmalogénios de etanolamina (PE _{plsm}).....	40
Tabela 9 – Teor em ácidos gordos totais (mg/g amostra) e composição em ácidos gordos (% do total de ácidos gordos) dos plasmalogénios de serina (PS _{plsm}).....	42
Tabela 10 – Teor total de dimetilacetais (µg/g amostra) e composição em dimetilacetais (% do total de dimetilacetais) dos plasmalogénios de colina (PC _{plsm}).....	44
Tabela 11 – Teor total de dimetilacetais (µg/g amostra) e composição em dimetilacetais (% do total de dimetilacetais) dos plasmalogénios de etanolamina (PE _{plsm}).....	45
Tabela 12 – Teor total de dimetilacetais (µg/g amostra) e composição em dimetilacetais (% do total de dimetilacetais) dos plasmalogénios de serina (PS _{plsm}).....	46
Tabela 13 – Fatores de conversão (FC) médios de ácidos gordos (AG) e/ou dimetilacetais (DMA) nas classes lipídicas dos bivalves estudados.....	47
Tabela 14 – Determinação dos fatores de conversão – exemplo: mexilhão (M2).....	48

Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Composição em lípidos totais (g/100g alimento) dos bivalves: lambujinha (Lb), ameijoia (A), ostra (O), mexilhão (M), berbigão (B) e longueirão (Lg).....	26
Gráfico 2 – Composição percentual de lípidos neutros e fosfolípidos dos bivalves: lambujinha (Lb), ameijoia (A), ostra (O), mexilhão (M), berbigão (B) e longueirão (Lg).....	27
Gráfico 3 – Composição percentual das classes lipídicas de lípidos neutros (LN): ésteres de colesterol (EC), triacilgliceróis (TAG) e ácidos gordos livres (AGL) dos bivalves: lambujinha (Lb), ameijoia (A), ostra (O), mexilhão (M), berbigão (B) e longueirão (Lg).....	27
Gráfico 4 – Composição percentual das classes dos fosfolípidos de colina (PC), etanolamina (PE), serina (PS) e inositol (PI) dos bivalves: lambujinha (Lb), ameijoia (A), ostra (O), mexilhão (M), berbigão (B) e longueirão (Lg).....	28
Gráfico 5 – Composição percentual das classes de fosfolípidos diacil e plasmalogénios (plsm) de: A – colina (PC), B – etanolamina (PE) e C – serina (PS) dos bivalves: lambujinha (Lb), ameijoia (A), ostra (O), mexilhão (M), berbigão (B) e longueirão (Lg).....	29
Gráfico 6 – Conteúdo total de plasmalogénios (mg/100g alimento) nos bivalves: lambujinha (Lb), ameijoia (A), ostra (O), mexilhão (M), berbigão (B) e longueirão (Lg).....	49

Abreviaturas e Siglas

% – percentagem

°C – graus celsius

µg - micrograma

µL – microlitro

µm - micrómetros

AA – ácido araquidónico

DHA – ácido docosaheptaenóico

DHAP – fosfato-dihidroxiacetato

DMA – dimetilacetal

EPA – ácido eicosapentaenóico

FACF – fatores de conversão de ácidos gordos

FAME – ácidos gordos sob a forma de ésteres metílicos

g – grama

GC – cromatografia gasosa

GC-FID – cromatografia gasosa com deteção por ionização de chama

GC-MS – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

GPA – 1-O-alkil-2-hidroxi-sn-glicerofosfato

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

KLU – quilo unidades lipase

LC-MS – cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa

m – metro

M – molar

mg – miligramas

mL – mililitros

mm – milímetros

MS – espectrometria de massa

MUFA – ácidos gordos monoinsaturados

NMI – ácidos gordos não interrompidos com grupos metileno

PC – fosfolípidos de colina

PC_{diacil} – fosfatidilcolina

PC_{plsm} – plasmenilcolina

PE – fosfolípidos de etanolamina

PE_{diacil} – fosfatidiletanolamina

PE_{plsm} – plasmeniletanolamina

PI – fosfolípidos de inositol
PLA1 – fosfolipase A1
PLA2 – fosfolipase A2
PS – fosfolípidos de serina
PS_{diacil} – fosfatidilserina
PS_{plsm} – plasménilserina
PUFA – ácidos gordos polinsaturados
ROS – espécies reativas de oxigénio
SFA – ácidos gordos saturados
SPE – cromatografia de extração em fase sólida
TLC – cromatografia em camada fina
v/v – volume/volume

Capítulo 1: Revisão Bibliográfica

1. Bivalves no sector das pescas e na alimentação

O consumo mundial de pescado tem vindo a crescer nas últimas 5 décadas, tendo-se verificado um aumento anual médio de 3,2%, acompanhando também o crescimento da população mundial, que está a aumentar, em média, 1,6% por ano. Também o consumo mundial de pescado, *per capita*, tem vindo a aumentar: de 9,9 kg, nos anos 60, para 19,7 kg, em 2013 (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2016). Em Portugal, de acordo com os dados da Balança Alimentar Portuguesa (Instituto Nacional de Estatística [INE], 2014), entre os anos 2008-2012 as disponibilidades diárias, *per capita*, de pescado reduziram cerca de 13%, o que equivale a menos 3,2 kg de pescado disponível, *per capita*, para consumo, nestes 5 anos. Para esta redução contribuíram os decréscimos nas disponibilidades absolutas de peixe para consumo, de cerca de 13,3% entre os anos anteriormente referidos, e de crustáceos e moluscos, em cerca de 27,2% no mesmo período de tempo. Segundo os mesmos dados referenciados na Balança Alimentar Portuguesa e, estando as disponibilidades alimentares indiretamente relacionadas com a caracterização do consumo alimentar, o consumo anual de crustáceos e moluscos corresponde a cerca de 3,65 kg/pessoa/ano.

Em Portugal, são comercializadas cerca de 16 espécies de bivalves provenientes de diversas zonas de produção (Figura 1). Entre estes, encontram-se a amêijoia (*Ruditapes spp.*), berbigão (*Cerastoderma edule*), mexilhão (*Mytilus spp.*), lambujinha (*Scrobicularia spp.*), ostra (*Crassostera spp.*) e longueirão (*Ensis spp.*), mais conhecido como lingueirão ou canivete (Instituto de Investigação das pescas e do Mar [IPIMAR], 2008). A localização geográfica de Portugal e as condições ambientais que apresenta influenciam de forma positiva a produção de moluscos bivalves, sendo estes produzidos no litoral e em zonas estuarino-lagunares ao longo da sua costa. Também se podem encontrar em bancos naturais e em viveiros (Instituto Português do Mar e da Atmosfera [IPMA], 2015).

Os bivalves são utilizados largamente como alimento em todo o mundo. Em Portugal, os mais consumidos são a ameijoia japonesa (*Ruditapes philippinarum*) e ameijoia-mancha (*Venerupis pullastra*). Normalmente são consumidos em casa ou em restaurantes, maioritariamente no Verão, e, sob a forma crua, como nas ostras, ou cozinhados, quando consumidos como “petisco” ou mesmo em pratos típicos, como na Carne de Porco a Alentejana (Anacleto, Barrento, Nunes, Rosa & Marques, 2014).

Figura 1. Algumas espécies bivalves da costa portuguesa



Legenda: A - ameijoia japonesa (*Ruditapes philippinarum*); B - mexilhão (*Mytilus spp.*); C – longueirão (*Ensis spp.*); D – berbigão (*Cerastoderma spp.*); E – lambujinha (*Scrobicularia plana*); F – ostra (*Crassostera spp.*)

2. Valor nutricional dos bivalves

Os bivalves têm sido, ao longo dos anos, considerados como tendo alguns atributos para a saúde, muito devido à sua elevada qualidade nutricional. De acordo com as análises nutricionais (Tabela 1) disponibilizadas pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) (2007), os bivalves são ricos em proteínas (11%), e apresentam baixo teor em gordura (1,2%). Em relação aos hidratos de carbono, a quantidade existente é reduzida (3%), apresentando-se sobre a forma de glicogénio. Consequentemente, também apresentam um valor energético reduzido, uma média de 65 kcal por cada 100g de alimento consumido. Além disto, são baixos em colesterol e apresentam teores em ácidos gordos polinsaturados superiores aos ácidos gordos saturados (0,4 % vs 0,2%). Assim, dado este perfil lipídico, o seu consumo poderá, entre outras, ajudar a reduzir o risco de desenvolver doenças cardiovasculares, em adultos, bem como ajudar no desenvolvimento cognitivo das crianças (Nesheim & Yaktine, 2007).

Tabela 1. Composição química de bivalves (INSA, 2007)

Bivalve	Ameijoia	Berbigão	Mexilhão	Ostra
Valor energético (kcal/100g)	66	60	69	64
Água (g/100g)	81,1	82,5	82,5	83,0
Proteína (g/100g)	11,7	10,2	12,1	8,6
Lípidos totais (g/100g)	0,9	0,7	1,5	1,7
HC totais (g/100g)	2,6	2,7	2,0	3,9
SFA (g/100g)	0,2	0,1	0,3	0,3
MUFA (g/100g)	0,1	0,1	0,3	0,3
PUFA (g/100g)	0,2	0,3	0,5	0,5

Abreviaturas: HC – hidratos de carbono; SFA – ácidos gordos saturados; MUFA – ácidos gordos monoinsaturados; PUFA – ácidos gordos polinsaturados

3. Classificação lipídica

Os lípidos são um grupo de compostos diversos e ubíquos que apresentam muitas funções biológicas. Eles são um dos componentes estruturais das membranas celulares, são fonte de reserva de energia e até participam em diversas vias de sinalização dos sistemas metabólicos (Fahy et al., 2005). Além destas, também se sabe que alguns tipos de lípidos podem ter um papel importante na redução de risco de desenvolvimento de determinadas patologias, como a obesidade, aterosclerose, hipertensão e mesmo a diabetes (Braverman & Moser, 2012). A diversidade de funções dos lípidos deve-se à enorme variedade das suas estruturas moleculares, sendo por isso, necessário proceder à sua classificação para ajudar a identificá-los.

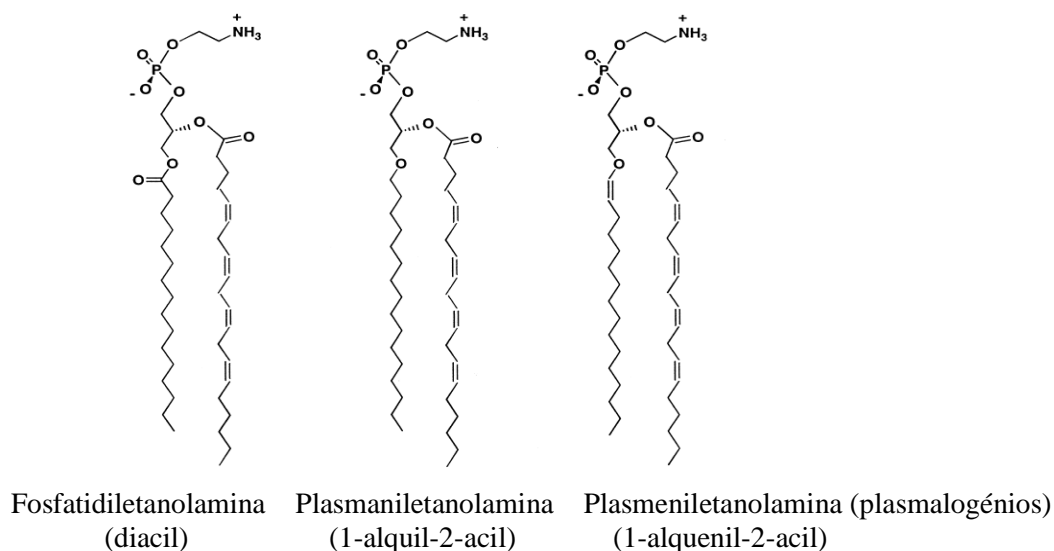
De um modo comum, os lípidos são definidos como sendo um grupo de compostos orgânicos que são insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos. Estas características químicas estão presentes numa ampla gama de moléculas, como por exemplo, nos ácidos gordos, (glicero)fosfolípidos, esteróis, esfingolípidos ou terpenos. Verifica-se, então, que os lípidos, de facto, compreendem um conjunto vasto de moléculas extremamente heterogéneas do ponto de vista estrutural e funcional. Assim, numa iniciativa do Consórcio LIPID MAPS, o International Lipid Classification and Nomenclature Committee, desenvolveu e estabeleceu um sistema de classificação para os lípidos de acordo com os seus princípios químicos e bioquímicos. Assim, eles foram divididos em: ácidos gordos, glicerolípidos, (glicero)fosfolípidos, esfingolípidos, sacarolípidos, esteróis, policetídios e prenóides (Fahy et al., 2005).

4. Fosfolípidos e Plasmalogénios

Os fosfolípidos são lípidos anfipáticos encontrados em todas as células membranares das plantas e animais, organizados em bicamadas lipídicas. Os fosfolípidos encontrados na maioria das membranas são principalmente glicerofosfolípidos. Estes consistem numa molécula de glicerol, ao qual está ligado, na posição sn-3, um grupo fosfato, esterificado, que constitui a zona polar (hidrofílica), que se encontra direcionada para a superfície exterior das membranas, e, também, por ácidos gordos nas posições sn-1 e sn-2, que compreendem a zona hidrofóbica, que está direcionada para o compartimento interior da membrana (Schwalbe-Herrmann, Willmann & Leibfritz, 2010; Küllenberg, Taylor, Schneider & Massing, 2012).

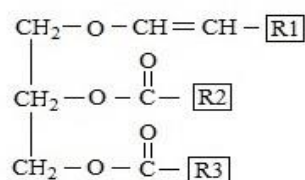
Na posição sn-3 do glicerol pode-se encontrar, em maior extensão, a colina ou etanolamina, em menor extensão, inositol ou serina e, raramente, a treonina. A diversidade dos glicerofosfolípidos é dada pelos componentes nas posições sn-1 e sn-2, formando as subclasses diacil- e éter-glicerofosfolípidos. Estes últimos diferem dos diacil-glicerofosfolípidos na posição sn-1. Os éter-glicerofosfolípidos apresentam na posição sn-1 uma ligação éter, enquanto que os diacil-glicerofosfolípidos têm uma ligação éster. Nos éter-glicerofosfolípidos, as cadeias carbonadas podem estar ligadas ao glicerol por uma ligação éter não modificada, formando assim o 1-O-alkilo, também denominada de plasmanil-glicerofosfolípido, ou por uma ligação éter modificada, a ligação éter vinílica, formando o 1-O-(1Z-alkenil), denominado de plasménil-glicerofosfolípido ou plasmalogénio (Figura 2). A maioria dos éter-glicerofosfolípidos são plasmalogénios. A posição sn-2 dos plasmalogénios é ocupada por ácidos gordos, ligados ao glicerol por uma ligação éster (Brites, Waterham, & Wanders, 2004; Braverman & Moser, 2012).

Figura 2. Estrutura das três subclasses de fosfolípidos da etanolamina. Adaptado de Nagan & Zoeller, 2001



Sabe-se que, além das ligações éter associadas aos lípidos polares, os fosfolípidos, também existem ligações éter associadas a lípidos neutros, como os triacilgliceróis. Nestes, tal como nos fosfolípidos, de acordo com o tipo de ligação na posição sn-1 do glicerol, pode-se ter grupos alquilo, se tiver uma ligação éter, sendo denominados de 1-O-alkil-2,3-diacil-gliceróis (éter diacil-glicerol), ou alquenilo, se tiver uma ligação éter vinílica na posição sn-1, sendo estes denominados de plasmalogénios neutros (1-alquenil-2,3-diacil-gliceróis) (Figura. 3). Nas posições sn-2 e sn-3 encontram-se grupos acilo, ligados ao glicerol por ligações éster (Magnusson & Haraldsson, 2011).

Figura 3. Estrutura dos plasmalogénios neutros. Adaptado de Magnusson & Haraldsson, 2011



Legenda: R1, R2 e R3 – cadeia carbonada

5. Composição lipídica dos plasmalogénios nos bivalves

Os bivalves são maioritariamente compostos por triacilgliceróis, ácidos gordos livres, esteróis e fosfolípidos. Dentro dos fosfolípidos, os plasmalogénios são aqueles que se mostram mais elevados, e têm vindo a ser estudados e quantificados em diversas espécies de bivalves (Fernández-Reiriz, Garrido & Irisarri, 2015). No entanto, relativamente aos bivalves da costa portuguesa ainda não se conhece a sua composição lipídica, nomeadamente no que diz respeito aos plasmalogénios.

Há muitos anos que se sabe que os seres marinhos invertebrados, como os bivalves, são ricos em lípidos com ligações éter, nomeadamente em plasmalogénios, apresentando apenas pequenas quantidades da sua forma alquilo. De facto, os bivalves geralmente apresentam uma concentração igual ou superior em plasmalogénios que o cérebro ou o coração de alguns mamíferos (Kraffe, Soudant & Marty, 2004). E, apesar de não ser uma fonte de plasmalogénios como a carne de porco, vaca ou mesmo de frango, os bivalves conseguem ultrapassar o peixe (Tabela 2) (Fogerty, Whitfield, Svoronos & Ford, 1991).

Tabela 2. Composição em plasmalogénios (% do total de fosfolípidos) em várias fontes alimentares

Fonte alimentar	PE _{plsm}	PS _{plsm}	PC _{plsm}
Bivalves ^a	20-35	13-29	0,9-3
Carne Porco ^b	49	-	12
Carne Vaca ^b	43	-	28
Carne Frango ^b	41	-	10
Peixe ^b	14	-	0,9

Abreviaturas: PE_{plsm} – plasmeniletanolamina; PS_{plsm} – plasmenilserina; PC_{plsm} - plasmenilcolina

^a Hanuš et al. (2009)

^b Fogerty et al. (1991)

Em vários estudos realizados ao longo dos anos, envolvendo bivalves, tem-se verificado que na posição sn-3 dos plasmalogénios, a etanolamina é o componente principal, sendo seguido pela serina e depois pela colina (Dembitsky & Vas'kovsky, 1976; Dembitsky, Kashin & Stefanov, 1992; Dembitsky, Rezanka, & Kashin, 1993; Kraffe et al., 2004; Hanuš, Levitsky, Shkrob & Dembitsky, 2009). Contudo, a composição lipídica dos bivalves é variável com a espécie em causa e mesmo dentro da mesma espécie, quer qualitativamente quer quantitativamente. Isto porque, a sua composição lipídica é afetada tanto por fatores externos, como as condições ambientais onde vivem, como a temperatura, e também com a disponibilidade e/ou qualidade do alimento ingerido; como por fatores internos. Tem-se descrito uma distribuição heterogénea de lípidos ao longo do seu corpo, muito provavelmente afetado por fatores fisiológicos e anatómicos. Deste modo, tem se verificado diferenças de acordo com o tipo de músculo e a sua localização, bem como com a idade, sexo e maturação sexual da espécie (Bergé & Barnathan, 2005, Nollet & Toldrá, 2010).

Apesar desta possível variação na composição lipídica, de acordo com diversos estudos (Ackman, 1983; Dembitsky et al., 1992; Dembitsky et al., 1993; Kraffe et al., 2004; Bergé & Barnathan, 2005; Saito, 2008; Hanuš et al., 2009; Barnathan, 2009; Ruano, Ramos, Quaresma, Bandarra & Pereira 2012), existem vários componentes lipídicos em comum entre as espécies bivalves. Na sua maioria, apresentam uma larga variedade de ácidos gordos, entre os quais os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) que se encontram em maior quantidade, entre os quais os ácidos gordos de cadeia longa com 20 e 22 átomos de carbono, como o ácido eicosapentaenóico, C20:5-n-3 (EPA), ácido docosahexaenóico, C22:6-n-3 (DHA) e o ácido araquidónico, C20:4-n-6 (AA). Estes são seguidos pelos ácidos gordos saturados (SFA), estando presentes principalmente o palmítico, C16:0, e o esteárico, C18:0. E, por último, os ácidos gordos monoinsaturados (MUFA), como o C16:1, C18:1 e C20:1. Além destes, os bivalves também apresentam ácidos gordos pouco comuns, como ácidos gordos não interrompidos com grupos

metileno (NMI). As espécies animais marinhas são conhecidas por conter grandes quantidades destes ácidos gordos. Nos bivalves, os mais comuns são os $\Delta 5,11$ -C20:2, $\Delta 5,13$ -C20:2, $\Delta 7,13$ -C22:2 e o $\Delta 7,15$ -C22:2 (Dembitsky et al., 1993; Kraffe et al., 2004; Hanuš et al., 2009).

Em relação à composição das cadeias carbonadas do grupo éter dos plasmalogénios, os mais comuns nos bivalves são o C16:0, C18:0, C18:1 e C20:1 (Hanus et al., 2009).

No que diz respeito aos plasmalogénios neutros, sabe-se que estes encontram-se em quantidades elevadas em algumas espécies marinhas, como o tubarão (Christie, 2014). No entanto, não existem muitas referências que mencionem a sua presença em bivalves, com exceção de um estudo realizado por Hanuš et al. (2009).

6. Bivalves, longevidade e composição lipídica das membranas

De uma perspetiva evolucionária, o metabolismo lipídico é mais importante para as funcionalidades membranares do que para o metabolismo energético. Assim, o papel dos lípidos na função membranares é importante, não apenas devido à sua influência na atividade das proteínas membranares, dada a sua natureza física, mas também porque eles são quimicamente modificados como parte de muitos processos (Hulbert, Kelly, & Abbott, 2014).

Vários estudos realizados em mamíferos e aves têm demonstrado que a suscetibilidade dos lípidos das membranas à peroxidação, denominado de Índice de Peroxidação, está correlacionado de modo negativo com a longevidade. Ou seja, quanto menor o Índice de Peroxidação maior será a longevidade da espécie animal (Munro & Blier, 2012).

Também os moluscos bivalves têm sido utilizados como modelos para estudos sobre a longevidade, dado estes conseguirem atingir vidas úteis elevadas. Um dos moluscos bivalves com maior longevidade, encontrado até ao momento, com uma idade de 507 anos, foi o *Artica islandica* (Munro & Blier, 2012).

Num estudo sobre a longevidade dos moluscos, procurando responder à questão do porquê de estes seres conseguirem atingir idades tão avançadas, Munro e Blier (2012), compararam a composição em lípidos das membranas mitocondriais de *A. Islandica* com outras 4 espécies de bivalves marinhos: *Mya arenaria*, *Spisula solidissima*, *Mactromeris polynyma* e *Mercenaria mercenaria*. Estas 5 espécies reúnem 4 condições que faz delas um modelo adequado para estudos que envolvem o envelhecimento/longevidade. Ambas se encontram na mesma área de distribuição, apresentam tamanhos semelhantes, são membros de classes taxonómicas aproximadas e apresentam grandes diferenças entre si na sua longevidade máxima. Com este estudo, os autores, encontraram uma relação negativa entre o Índice de peroxidação das membranas e a longevidade dos bivalves (Hulbert et al., 2014).

O valor de Índice de Peroxidação das membranas está em parte relacionado com a sua composição lipídica. Uma baixa abundância de PUFA, como o DHA, que são sensíveis à peroxidação, geralmente reduz o valor do Índice de Peroxidação, com o concomitante aumento da longevidade. Por exemplo, nos bivalves com menor vida útil, o conteúdo em DHA é mais abundante do que aquele encontrado nos bivalves com maior vida útil, como acontece com a *A. Islandica*, que apresenta pouco conteúdo deste ácido gordo nas membranas celulares. Outra característica composicional das membranas que poderá estar relacionada com a relação Índice de peroxidação/longevidade dos bivalves é, também, a presença de ácidos gordos NMI, presentes em quantidades significativas nas membranas dos bivalves. Estes ácidos gordos têm o potencial de reduzir a suscetibilidade à peroxidação, pois apesar de fornecerem as mesmas propriedades físicas dos PUFA, dada a sua estrutura distinta (as duplas ligações estão separadas por mais de um grupo metileno), estes são menos suscetíveis à peroxidação lipídica, ajudando a reduzir assim o valor do Índice de Peroxidação, contribuindo para o aumento da longevidade (Munro & Blier, 2012).

Contudo, a elevada longevidade que estes seres conseguem alcançar, não se deve apenas ao baixo Índice de Peroxidação das membranas celulares. Os bivalves, como seres que apresentam uma elevada proporção de plasmalogénios nas suas membranas, vão ajudar a reduzir a suscetibilidade à peroxidação, independentemente do valor do Índice de Peroxidação da membrana, dado o seu papel como antioxidante endógeno. Estes conferem assim uma proteção adicional contra a peroxidação lipídica nas membranas destes organismos, contribuindo para o aumento da sua longevidade. Tal como anteriormente, a espécie com menor conteúdo em plasmalogénios mostrou ter uma menor longevidade do que aquela que apresentava um maior teor de plasmalogénios nas suas membranas (Munro & Blier, 2012).

Assim, verifica-se que a longevidade dos seres vivos, incluindo o Homem (além do fator genético, que também poderá ter influência) poderá estar dependente da suscetibilidade à peroxidação, como consequência da composição em ácidos gordos das suas membranas. E, devido a isto, quanto maior for o conteúdo em PUFA nas membranas celulares e menor o conteúdo em lípidos que protegem as células da peroxidação lipídica (ácidos gordos NMI e plasmalogénios), maior será o stress oxidativo daquelas membranas, levando, então, à redução da longevidade de determinada espécie.

7. Importância dos plasmalogénios em Humanos

Os plasmalogénios encontram-se abundantemente nas membranas biológicas (Lessig & Fuchs, 2009). No entanto, em tecidos diferentes e, possivelmente, até mesmo em diferentes tipos de células dentro do mesmo tecido, o teor em plasmalogénios pode variar (Brites et al., 2004) (Tabela 3).

Tabela 3. Conteúdo em plasmalogénios em diferentes tecidos humanos. Adaptado de Braverman & Moser, 2012

Tecido	PE _{plsm} (% PE)	PC _{plsm} (% PC)	Plasmalogénios (% total de fosfolípidos)
Cérebro	58	1	22
Massa Cinzenta			
Córtex frontal	57	-	54
Córtex parietal	58	-	51
Córtex temporal	56	-	-
Cerebelo	63	-	-
Massa Branca			
Córtex frontal	84	-	76
Córtex parietal	81	-	100
Córtex temporal	83	-	-
Cerebelo	78	-	-
Coração	53	26	-
Rim	46	5	-
Músculo esquelético	48	19	-
Fígado	8	3	-

Abreviaturas: PE_{plsm} – plasmeniletanolamina; PE – fosfolípidos da etanolamina; PC_{plsm} – plasmenilcolina; PC – fosfolípidos da colina

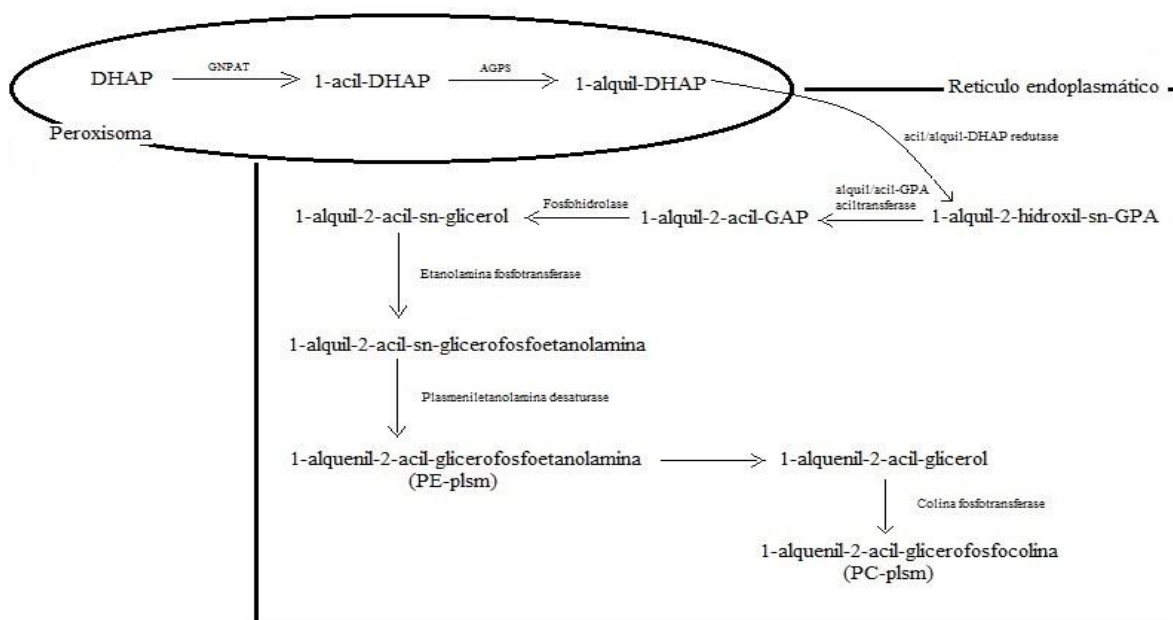
Os plasmalogénios constituem cerca de 15-20% do total de fosfolípidos nas membranas celulares, em humanos. Nestes, cerca de 50% da plasmeniletanolamina (PE_{plsm}) encontra-se no cérebro, nomeadamente na mielina e, em certas zonas do cérebro, podem até representar mais de 90%. O PE_{plsm} também está presente em grande quantidade no coração, rim, pulmões e músculo esquelético. A menor quantidade de plasmalogénios encontra-se no fígado (Braverman & Moser, 2012). Em relação à plasmenilcolina (PC_{plsm}), o coração é o órgão humano que maior quantidade apresenta (Brites et al., 2004; Braverman & Moser, 2012). Os plasmalogénios também são importantes nas membranas subcelulares, encontrando-se nestas em quantidades significativas, como no núcleo, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e mitocôndria (Braverman & Moser, 2012). Os níveis de plasmalogénios tecidulares também estão relacionados, com a idade do organismo. O teor de plasmalogénios no cérebro aumenta durante

o desenvolvimento da mielina, chegando ao seu máximo por volta dos 30 anos de idade. Depois, com o envelhecimento, a quantidade em plasmalogénios começa a diminuir (Lessig & Fuchs, 2009; Braverman & Moser, 2012).

7.1. Biossíntese de plasmalogénios

Os fosfolípidos com ligação éter são sintetizados numa via comum, que se inicia na membrana do peroxisoma. A representação esquemática da biossíntese dos plasmalogénios é representada na Figura 4.

Figura 4. Biossíntese de plasmalogénios. Adaptado de Braverman & Moser, 2012



Abreviaturas: DHAP – fosfato-dihidroxiacetona; GNPAT – glicerona fosfato aciltransferase; AGPS – alquilglicerona fosfato sintase; GPA – glicero fosfato

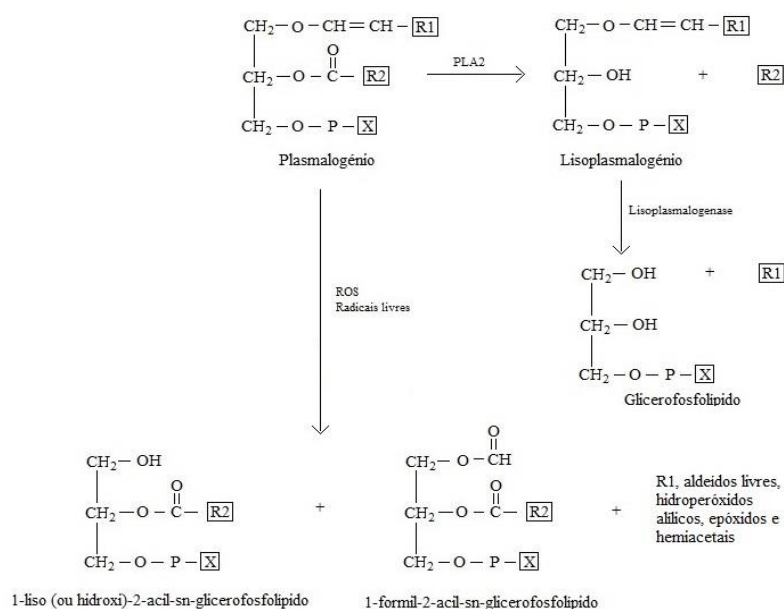
Resumidamente, e utilizando como exemplo a síntese de PE_{plsm}, esta inicia-se com a esterificação do fosfato-dihidroxiacetona (DHAP), na posição sn-1, seguida pela troca do grupo acilo, que foi transferido, por um grupo alquila. Depois, o 1-alquil-DHAP formado é reduzido a 1-O-alquil-2-hidroxil-sn-glicero fosfato (GPA). A enzima responsável por esta etapa encontra-se localizado tanto no peroxisoma como no reticulo endoplasmático. As restantes modificações que ocorrem na formação dos plasmalogénios acontecem neste último compartimento celular. A primeira corresponde à colocação de um grupo acilo na posição sn-2 e, posterior remoção do grupo fosfato, para formar 1-O-alquil-2-acil-sn-glicerol. Este depois é transformado em 1-O-alquil-2-acil-sn-glicero fosfoetanolamina. Por último, este composto é desidrogenado na posição 1 e 2 do grupo alquila para formar a ligação éter vinílica, dando assim origem à PE_{plsm} (Brites et al., 2004; Braverman & Moser, 2012).

7.2. Funções biológicas dos plasmalogénios

A maioria dos lípidos presentes nas membranas plasmáticas são glicerofosfolípidos. Entre eles encontram-se, então, os plasmalogénios. Estes apresentam várias funções no nosso organismo. Além do seu papel como componente estrutural das membranas celulares também são importantes como mediadores na dinâmica membranar. Esta função deve-se à sua estrutura química, que conferem às membranas características físicas e químicas únicas, como a fluidez e permeabilidade membranar, bem como a promoção das fusões membranares, como aquelas que ocorrem na endocitose e na secreção de vesículas (Nagan & Zoeller, 2001; Farooqui, Farooqui, & Horrocks, 2008; Lessig & Fuchs, 2009). Contudo, pensa-se que a fusão das membranas seja um processo multi-componente, no qual também o colesterol, glicolípidos e proteínas podem estar envolvidos juntamente com os plasmalogénios (Nagan & Zoeller, 2001; Farooqui et al., 2008; Braverman & Moser, 2012).

Uma outra função importante dos plasmalogénios é como mediadores lipídicos e reservatório de mensageiros secundários, como os eicosanóides e docosanóides. Esta função deve-se ao facto dos plasmalogénios poderem estar enriquecidos com DHA e AA. Estes podem ser libertados, por hidrólise, pela ação da enzima fosfolipase A2 (PLA2) (Figura 5), específica para a ligação sn-2 dos plasmalogénios. Dentro dos plasmalogénios, o PE_{plsm} constitui o maior reservatório de armazenamento de DHA e AA (Brites et al., 2004; Lessig & Fuchs, 2009; Braverman & Moser, 2012).

Figura 5. Ação da fosfolipase A2 sobre os plasmalogénios e reação de oxidação dos plasmalogénios. Adaptado de Braverman & Moser, 2012



Legenda: R1 – C16:0, C18:0 ou C18:1; R2 – DHA ou AA; X – etanolamina, colina, serina ou inositol

Uma das funções dos plasmalogénios, que poderá ter influência no desenvolvimento de algumas patologias, bem como na longevidade dos humanos e de outras espécies animais, é a sua função como antioxidante endógeno, protegendo outros fosfolípidos, lípidos e lipoproteínas das reações oxidativas. A presença da ligação éter vinílica na posição sn-1 do glicerol, faz com que os plasmalogénios sejam suscetíveis ao ataque oxidativo (Brites et al., 2004; Lessig & Fuchs, 2009). Consequentemente, a fração éter vinílica dos plasmalogénios constituem, assim, um importante alvo para, entre outros, as espécies de oxigénio reativas (ROS). Além disto, sabe-se que os produtos resultantes da oxidação dos plasmalogénios são incapazes de propagar mais a peroxidação lipídica, pondo assim termo a esta. Contudo, continua por determinar se os produtos resultantes da oxidação por si mesmo podem ou não ser prejudiciais (Figura 5) (Lessig & Fuchs, 2009; Braverman & Moser, 2012).

Também a ocorrência de plasmalogénios na fenda sináptica sugere que, além do seu importante papel na sinaptogénese, também possa estar envolvido na formação de vesículas durante a libertação de neurotransmissores (Farooqui et al., 2008).

Deste modo, pode-se verificar que os plasmalogénios têm funções únicas e, sabe-se que estas estão diretamente relacionadas com a ligação éter vinílica na posição sn-1 e com a presença de PUFA na posição sn-2 do glicerol (Braverman & Moser, 2012).

7.3. Plasmalogénios na doença

A importância dos plasmalogénios na saúde humana é destacada pela identificação de desordens na qual a biossíntese de plasmalogénios é deficiente. Em diversos estados patológicos verifica-se uma alteração nos conteúdos em plasmalogénios. Por exemplo, na síndrome de Zellweger, verifica-se uma deficiência na síntese de plasmalogénios a partir dos peroxisomas, por deficiência nas enzimas envolvidas na sua síntese. Este baixo conteúdo em plasmalogénios, nomeadamente a nível cerebral, pode ser crítico para as alterações neurológicas que estes doentes apresentam (Brites et al., 2004; Lessig & Fuchs, 2009).

O cérebro é o órgão humano que maior teor em plasmalogénios apresenta. Por isso, não é surpreendente que se encontrem baixas concentrações desta molécula em diversas doenças degenerativas, como se verifica na Doença de Alzheimer. Contudo, ainda está por determinar se esta redução no conteúdo em plasmalogénios é uma causa ou um efeito da patologia em si, ou mesmo, se são os dois cenários em simultâneo (Braverman & Moser, 2012). Vários estudos sobre o Alzheimer e os plasmalogénios têm demonstrado que a sua deficiência, juntamente com a disfunção generalizada dos peroxisomas, podem ser marcadores específicos destas doenças. Além disto, sabe-se que a redução dos plasmalogénios é uma das primeiras mudanças bioquímicas detetadas no Alzheimer, nomeadamente, ao nível dos PE_{plsm} e PC_{plsm}, nas zonas

do cérebro que apresentam degeneração ativa (Brites et al., 2004; Wood et al., 2010; Braverman & Moser, 2012). Os níveis de plasmalogénios nestes doentes também se correlacionam com os diferentes estados de demência dos doentes. Han, Holtzman, e McKeel (2001), verificaram que, mesmo em estados iniciais da doença, no qual o estado de demência é reduzido, já existe uma redução dos níveis de plasmalogénios. E, os pacientes com um nível maior de demência têm uma maior redução nos seus níveis. Wood et al. (2010) mostraram que também os níveis de plasmalogénios nos eritrócitos se correlacionam com a severidade da doença, sugerindo uma etiologia sistemática para a redução dos plasmalogénios. Sabe-se, também, que a redução de plasmalogénios pode estar correlacionada com a diminuição na sua síntese secundária e com a perda geral das funções do peroxisoma no cérebro (Kou et al., 2011). Também os níveis de DHA, incluindo aquele contido nos plasmalogénios, estão reduzidos, quer no sangue quer no cérebro. Esta redução resulta em muitos efeitos prejudiciais na função neuronal, que muito provavelmente está na base da redução do estado cognitivo destes doentes (Wood et al., 2010). Esta deficiência em plasmalogénios no cérebro também pode ocorrer quer pelo stress oxidativo, conduzido pela degradação dos plasmalogénios pelos ROS, quer pelo aumento do catabolismo dos plasmalogénios pela PLA2, que está aumentada nestes doentes (Braverman & Moser, 2012). Contudo, e apesar do número de estudos existentes sobre o Alzheimer, a redução de plasmalogénios nesta patologia ainda é pouco compreendida (Lessig & Fuchs, 2009). Deste modo, dada a relação que existe entre os plasmalogénios e algumas patologias, tem surgido um interesse crescente em estudar os plasmalogénios, de modo a compreender melhor o seu papel e importância, quer nos humanos quer noutras espécies animais.

8. Reposição de plasmalogénios nos tecidos a partir da alimentação/suplementação

Vários estudos têm demonstrado que os mamíferos podem utilizar alquil-gliceróis, como suplementação, para a síntese de plasmalogénios, ou mesmo a ingestão direta de plasmalogénios através dos alimentos, que serão, posteriormente, incorporados nas membranas celulares de diferentes tecidos. A sua possível incorporação tem alguma significância clínica, dado a relevância que algumas doenças relacionadas com a deficiência em plasmalogénios têm assumido. Por exemplo, na Síndrome de Zellweger, sabe-se que a atividade das enzimas GNPAT e AGPS, localizadas no peroxisoma, está reduzida (tal como em outras patologias que envolvem desordens peroxisomais), levando, então, à deficiência em plasmalogénios. No entanto, as enzimas presentes no retículo endoplasmático, responsáveis pela conversão de 1-O-alquil-sn-glicerol até a formação de plasmalogénios, não estão alteradas (Das, Holmes, Wilson & Hajra, 1992).

Num estudo realizado por Nishimukai, Wakisaka e Hara (2003), determinou-se se os plasmalogénios obtidos através da alimentação seriam absorvidos e, se as suas concentrações aumentariam no sangue e nos tecidos dos ratos. Além disto, também se testaram se os plasmalogénios seriam ou não destruídos no estômago, devido à sua sensibilidade ao pH ácido. Verificou-se que estes não eram destruídos, e que ocorreu um aumento dos níveis de plasmalogénios no plasma, bem como no fígado, comprovando deste modo a sua absorção intestinal. Contudo, a sua concentração em tecidos como o cérebro, coração, pulmões, músculo e tecido adiposo permaneceram inalterados.

Num outro estudo, realizado por Mawatari, Katafuchi, Miake e Fujino (2012), estes autores afirmam que a ingestão de plasmalogénios pela alimentação pode ser eficiente na reposição de plasmalogénios ao nível dos tecidos dos ratos, dado a sua ingestão fornecer glicerol com a ligação éter vinílica, o grupo fosfato e os ácidos gordos, que podem depois ser reutilizados para a biossíntese de plasmalogénios em vários tecidos.

No entanto, apesar das evidências de que os plasmalogénios provenientes da alimentação podem ajudar na sua reposição ao nível dos tecidos, a maioria dos estudos realizados sobre esta temática envolvem precursores de plasmalogénios, nomeadamente alquil-gliceróis.

Das et al. (1992), num estudo desenvolvido em ratos que envolveu um precursor de plasmalogénios (1-O-heptadecil-sn-glicerol), verificou que este era incorporado na maioria dos tecidos, não se verificando, no entanto, alterações no conteúdo total de plasmalogénios. Além disso, mostrou que aquele precursor era utilizado para a síntese de fosfolípidos membranares na maioria dos tecidos. Contudo, no cérebro, a sua incorporação foi sempre muito baixa.

Num outro estudo, também desenvolvido em ratos, Brites et al. (2011) testaram outro precursor de plasmalogénios (1-O-octadecil-rac-glicerol), verificando, também, um aumento dos níveis de plasmalogénios em alguns tecidos. Contudo, no cérebro verificam apenas um ligeiro aumento. Mas, se a ingestão do precursor fosse prolongada, o aumento dos níveis de plasmalogénios neste órgão seria maior, verificando-se efeitos benéficos para o tecido nervoso. Estes autores também afirmaram que a restauração dos níveis de plasmalogénios pode parar ou, pelo menos, abrandar a progressão de patologias, dependendo do estado patológico dos tecidos afetados na altura da intervenção terapêutica.

Wood et al. (2011) num teste a outro precursor de plasmalogénios (1-O-hexadecil-2-DHA-sn-ácido lipóico), conseguiram demonstrar a sua capacidade de conversão em plasmalogénios na ação terapêutica do Alzheimer, em ratos. Estes verificaram que o precursor ajudou a ajustar os

níveis de plasmalogénios no cérebro, provando que este precursor pode oferecer uma abordagem terapêutica para o tratamento do Alzheimer, bem como para outras condições clínicas que envolvam disfunções peroxisomais.

Embora a maioria dos estudos realizados neste âmbito seja em experimentação animal, tem-se verificado que, tanto a suplementação com precursores de plasmalogénios como a própria ingestão de plasmalogénios através da alimentação, podem ser benéficas na melhoria das condições patológicas de alguns doentes que padecem de patologias que levam à deficiência em plasmalogénios, ajudando a corrigi-la. No entanto, é necessário o desenvolvimento de mais estudos sobre o seu modo de incorporação nos tecidos, principalmente ao nível cerebral, pois é neste órgão que se verifica um menor aumento dos níveis de plasmalogénios. Além disto, dado a escassez de estudos em humanos, também seria vantajoso que se realizassem mais estudos neste campo.

9. Análise da composição lipídica em bivalves

Ao longo dos anos, várias têm sido as metodologias analíticas utilizadas para avaliar a composição lipídica de diversas espécies animais, no qual estão incluídos os bivalves.

De um modo geral, não existe nenhum procedimento único que realize todas as análises desejadas para um determinado objetivo definido. Por isso, torna-se necessário combinar diversas técnicas para que esses fins sejam atingidos (Nollet & Toldrá, 2010).

Na maioria dos casos, o método mais popularmente utilizado para a extração lipídica é o descrito por Folch, Lees e Stanley (1957), o qual utiliza como solventes orgânicos para a extração de lípidos clorofórmio:metanol, numa proporção de 2:1 (v/v). Contudo existem outras metodologias com o mesmo princípio, como a de Bligh e Dyer (1959). Independentemente do método de extração, é aconselhável incluir um antioxidante nos solventes de extração, de modo a prevenir, principalmente, a oxidação dos ácidos gordos insaturados. Estas metodologias permitem determinar o teor lipídico total da amostra em estudo (Nollet & Toldrá, 2010).

Os extratos lipídicos obtidos na extração são misturas complexas de classes lipídicas. No entanto, por vezes, torna-se necessário realizar separação de frações lipídicas. Para esta também existem diversos procedimentos, como por exemplo a cromatografia em camada fina (TLC), a cromatografia de extração em fase sólida (SPE) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Nollet & Toldrá, 2010).

O TLC é descrito como o procedimento habitual na separação de frações lipídicas. O mais usual é o TLC monodimensional, em que se aplica o eluente numa única direção para a separação das classes lipídicas. É o caso da separação de lípidos simples. Contudo, por vezes, quando os

extratos lipídicos são mais complexos é necessário haver uma resolução dimensional, de modo a que haja uma melhor separação das frações lipídicas, como poderá acontecer na separação de fosfolípidos. Os lípidos separados podem depois ser detetados por reveladores como a 2',7'-diclorofluoresceína em metanol ou mesmo através de vapores de iodo. Estes são facilmente identificados pelas suas características migratórias, comparativamente a padrões que são corridos simultaneamente com as amostras em análise. Estes podem ainda ser recuperados quando o método de revelação é não destrutivo (Christie & Han, 2012). Outra técnica que se pode utilizar para o fracionamento de lípidos, com o recurso a colunas cromatográficas (cartuxos) com fases sólidas específicas, é o SPE. A separação ocorre numa sequência passo-a-passo, podendo-se utilizar vários tipos de fases sólidas. A mais utilizada para o isolamento de frações lipídicas simples e complexas são as colunas de aminopropil. A separação ocorre pela adição, consecutiva, de eluentes com diferentes polaridades, à amostra colocada na coluna (Nollet & Toldrá, 2010). Contudo, com o desenvolvimento e maior acessibilidade a instrumentos de HPLC, nos últimos anos, esta tem sido a técnica de separação mais utilizada no fracionamento e análise de frações lipídicas, pois além das separações serem mais consistentes e “limpas”, também permite a quantificação direta das frações lipídicas obtidas (Nollet & Toldrá, 2010). A cromatografia líquida quando acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) permite não só a separação, mas também a identificação rigorosa das frações lipídicas (Christie & Han, 2012).

Por vezes, também é necessário proceder ao isolamento de determinados componentes dentro de uma dada fração lipídica para a caracterização e quantificação dos seus ácidos gordos, como acontece com os plasmalogénios (Mawatari, Yunoki, Sugiyama, & Fujino, 2009). Nestes, várias têm sido as tentativas para o isolamento de plasmalogénios utilizando fosfolipases. Um método descrito por Mawatari et al. (2009) inclui a hidrólise dos diacil-glicerofosfolípidos pela ação da enzima fosfolipase A1 (PLA1) obtida a partir da *Aspergillus orizae*. Esta enzima é específica para a ligação éster da posição sn-1 dos diacil-glicerofosfolípidos e, parece hidrolisar a sua maioria, permanecendo os plasmalogénios intactos. Outros estudos envolvendo enzimas (Yang, Wang, Yang, Mainda & Guo, 2006; Mishra, Kumaraguru, Sheelu & Fadnavis, 2009) têm sido realizados, mostrando que a ação desta enzima realmente ajuda no isolamento dos plasmalogénios.

Na análise de composição lipídica também é importante determinar a composição em ácidos gordos presentes no extrato lipídico e/ou em cada uma das classes lipídicas. Uma das técnicas mais comumente utilizada é a cromatografia gasosa (GC) (Nollet & Toldrá, 2010). Contudo, antes da sua análise, os ácidos gordos e/ou os éteres vinílicos presentes nos extratos lipídicos

têm de ser convertidos em derivados não polares de baixo peso molecular, nomeadamente, a ésteres metílicos (FAME) e dimetilacetais (DMA). Para tal, é pratica comum proceder à esterificação e transesterificação dos componentes lipídicos, pela adição de um catalisador alcalino ou de um catalisador ácido ou mesmo pela combinação dos dois (Nollet & Toldrá, 2010). Após este, pode-se então proceder à análise qualitativa e/ou quantitativa dos ácidos gordos presentes por GC. Na análise qualitativa é comum acoplar o GC à espectrometria de massa (MS) para a identificação de ácidos gordos. Para a quantificação dos ácidos gordos recorre-se à área dos picos registada no cromatograma, sendo esta proporcional à quantidade de ácido gordo existente na amostra. Para o cálculo do seu peso é comum recorrer à padronização interna. Assim, antes de ocorrer a metilação dos componentes lipídicos, deve-se adicionar à amostra uma quantidade conhecida de um padrão, normalmente o ácido nonadecanóico (C19:0). Por fim, os resultados obtidos, normalmente, são expressos em percentagem de peso de ácidos gordos totais presentes (Nollet & Toldrá, 2010).

Por norma, as tabelas de composição de alimentos fornecem os seus dados em função do conteúdo de lípidos por cada 100 g de alimento. Por isso, por vezes, torna-se necessário converter a quantidade de ácidos gordos existentes em cada 100 g alimento. Para tal, é necessário estabelecer um fator apropriado que relacione o conteúdo de ácidos gordos com o conteúdo em lípidos totais de um dado alimento em estudo (Weihrauch, Posati, Anderson & Exler, 1977). O trabalho mais importante sobre fatores de conversão de lípidos foi desenvolvido por Weihrauch et al (1977). Eles determinaram fatores de conversão para diversos alimentos, estimando qual a quantidade de lípidos que seriam mesmo ácidos gordos. Assim, através destes fatores de conversão de ácidos gordos (FACF), conseguiram determinar qual o peso de ácidos gordos presentes numa grama de lípidos totais (Compilers' Toolbox™, 2016). Apesar dos FACF determinados por Weihrauch et al. (1977) funcionarem na maioria dos alimentos, quando se trata do pescado, incluindo crustáceos e moluscos (bivalves), não existe consistência no seu uso, dado a variação nestes fatores. Quando se trata do pescado, os FACF estão dependentes do conteúdo total de lípidos e, nos bivalves, estes são limitativos dado o seu baixo teor lípido (Nowak, Rittenschober, Exler & Charrondiere, 2014). Além disto, o teor lípido dos bivalves também é variável com a época do ano (Compilers' Toolbox™, 2016). Por este motivo, torna-se importante que sejam determinados FACF para o pescado, incluindo bivalves, mais consistentes e específicos.

Objetivos

Os plasmalogénios parecem ter relevância no estado de saúde e/ou doença nos humanos, dado as funções biológicas que estes apresentam. E, a sua ingestão pode beneficiar ou até mesmo retardar os efeitos nefastos que algumas patologias têm sobre os humanos. Uma fonte alimentar, descrita pela literatura, como sendo rica em plasmalogénios são os bivalves.

Apesar da existência de vários estudos sobre a sua composição lipídica, não se conhece, no entanto, a caracterização lipídica dos bivalves presentes na costa portuguesa, principalmente aquela que diz respeito aos plasmalogénios. Assim, o objetivo do trabalho realizado consistiu na caracterização e determinação do perfil lipídico, através da separação das frações lipídicas por cromatografia em fase sólida e análise por cromatografia gasosa, em especial de plasmalogénios, de vários bivalves da costa portuguesa. Pretendeu-se também verificar se estes são, realmente, uma boa fonte alimentar de plasmalogénios.

Adicionalmente, tornou-se também objetivo deste trabalho, determinar fatores de conversão lipídicos para as diferentes frações lipídicas dos bivalves em estudo. Isto porque, como a análise das frações lipídicas dos alimentos é um processo moroso e dispendioso, a maioria da informação existente é apresentada em percentagem de peso de ácidos gordos. Também, as tabelas de composição de alimentos, por norma, apresentam os conteúdos lipídicos sob a forma de lipídios presentes em 100 g de alimento. Assim, de modo a obter informação mais acessível sobre a ingestão de lípidos (por exemplo de plasmalogénios) a partir dos alimentos, em particular dos moluscos bivalves, é importante estabelecer fatores que permitam converter a composição em ácidos gordos e dimetilacetais no teor em plasmalogénios ou noutras classes lipídicas. Outro motivo que motivou a determinação destes fatores de conversão é o facto de não existirem tabelas recentes sobre estes, bem como, no trabalho mais completo sobre esta temática, os fatores de conversão serem limitativos quando se refere ao pescado, no qual se inserem os bivalves.

Capítulo 2: Materiais e Métodos

1. Amostras

Para a realização deste trabalho foram utilizadas 6 espécies diferentes de bivalves com produção na costa marítima portuguesa: ameijoia japonesa (*Ruditapes philippinarum*), lambujinha (*Scrobicularia plana*), berbigão (*Cerastoderma spp.*), mexilhão (*Mytilus spp.*), ostra (*Crassostera spp.*) e longueirão (*Ensis spp.*). Cada espécie foi composta por 3 amostras, cada uma com origem diferente, com exceção da lambujinha e longueirão, composta por duas amostras de origens diferentes e uma de origem repetida, recolhidas em altura do ano distintas (Anexo I). Os bivalves em questão foram cedidos pelo viveiro MecoMar Mariscos, localizado na zona de Sesimbra. Estes foram recolhidos no mês de outubro de 2015, para uma das amostras de lambujinha, e as restantes amostras, entre os meses de janeiro e março de 2016.

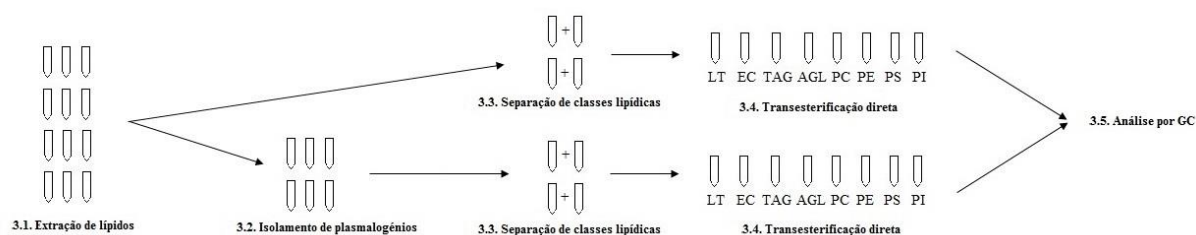
2. Preparação das amostras

Após a sua aquisição, as amostras foram congeladas de modo a facilitar a remoção das conchas, permanecendo apenas os tecidos moles dos bivalves, ou seja, toda a sua parte edível. Após este processo, as amostras voltaram a ser congeladas, pesadas, procedendo-se depois à liofilização, com recurso de um liofilizador Scavanc CoolSafe™, estando este a uma temperatura de -59°C. No fim, as amostras foram colocadas cerca de 1 hora no exsiccador, para o peso estabilizar, e procedeu-se à sua pesagem, para assim determinar o teor de matéria seca das respetivas amostras. Por fim, as amostras foram trituradas e homogeneizadas, através da utilização de um moinho, e guardadas no congelador a -23°C até à sua utilização.

3. Procedimentos analíticos

Os procedimentos analíticos utilizados, e de seguida descritos, foram processados de acordo com o esquema que se encontra na Figura 6.

Figura 6. Esquema do processo de análise lipídica utilizado



Abreviaturas: LT – lípidos totais; EC – ésteres de colesterol; TAG – triacilgliceróis; AGL – ácidos gordos livres; PC – fosfolípidos de colina; PE – fosfolípidos de etanolamina; PS – fosfolípidos de serina; PI – fosfolípidos de inositol; GC – cromatografia gasosa

3.1. Extração e quantificação de lípidos totais

A extração lipídica das amostras ocorreu de acordo com a metodologia descrita por Folch et al. (1957), com as devidas modificações, e utilizada pelo Laboratório de Sistemas de Produção Animal (CIISA), da Faculdade de Medicina Veterinária (Anexo II).

Resumidamente, para cada amostra pesou-se cerca de 0,200 g para tubos, num total de 12 réplicas por amostra, com recurso a uma balança com resolução de 0,0001 g (KernAEJ 100-4NM). Posteriormente, foi adicionado metanol em cada tubo, para humedecer a amostra, e depois os tubos foram colocados no banho de ultrassons (Elmasonic S 60H), para ajudar a desagregar os lípidos. Após isto, adicionou-se diclorometano, para extração dos lípidos, agitou-se no vortex (Heidolph Reax top) e voltou-se a colocar no banho de ultrassons, sendo depois a solução centrifugada (centrifuga Astor 8 New), para separação da fase sólida do solvente. Este último foi depois retirado, o máximo possível, para um novo tubo, passando por um filtro normal. À fase sólida adicionou-se, desta vez, diclorometano:metanol (2:1, v/v), agitou-se no vortex, foi novamente ao banho de ultrassons e à centrifuga, retirando-se o solvente para os mesmos tubos utilizados anteriormente. Este passo repetiu-se duas vezes. Por fim, ao filtrado obtido, foi adicionado uma solução aquosa de cloreto de potássio (0,88%), e após agitação no vortex centrifugou-se para separação das fases. A fase orgânica, inferior, foi transferida para erlenmeyer's, previamente tarados e pesados, passando por um filtro separador de fases. O solvente foi depois evaporado num evaporador rotativo (RV 10 Control, VWR by IKA) a 37°C, até à sua secura, para a posterior determinação do teor lipídico, por análise ponderal, no qual:

$$\text{Lípidos totais (mg/g MS)} = [\text{mEA (mg)} - \text{mE (mg)}] / \text{toma (g MS)}$$

mEA = massa do erlenmeyer + amostra

mE = massa do erlenmeyer

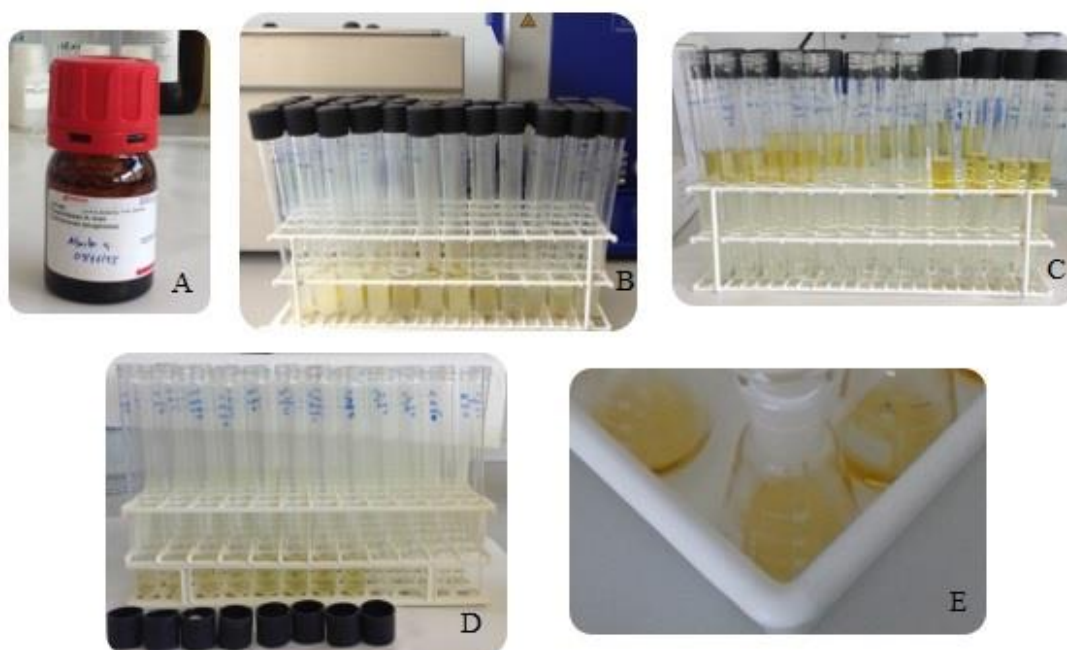
MS = matéria seca

3.2. Isolamento de plasmalogénios

O isolamento dos plasmalogénios do extrato lipídico de cada bivalve, foi efetuado de acordo com o descrito anteriormente (página 17). Assim, este foi realizado por hidrólise do grupo acilo na posição sn-1 dos diacil-glicerofosfolípidos, com a enzima Fosfolipase A1, Lecitase[™] Ultra (PLA1; EC 3.1.32) com atividade mínima de 10 KLU/g líquido, de acordo com o procedimento descrito por Mawatari et al. (2009), com as devidas modificações (Anexo III).

Aos lípidos anteriormente extraídos adicionou-se 3 mg da enzima PLA1 por cada mg de lípidos presentes nos tubos de vidro (Figura 7A), previamente pesados. A enzima encontrava-se em solução tampão (tampão citrato 0,1M, pH 4,5), previamente preparada. De seguida, os tubos de vidro foram colocados em banho de ultrassons por 5 minutos e depois incubados em banho-maria (Selecta Unitronic OR), com agitação, durante 4 horas e 30 minutos (Figura 7B). Findo este tempo, adicionou-se hexano:iso-propanol (3:2, v/v), para a extração dos lípidos, e agitou-se no vortex. Depois, adicionou-se uma solução aquosa de sulfato de sódio (6,6%), agitou-se novamente no vortex e centrifugou-se, para separação das fases (Figura 7C). A fase orgânica, superior, foi transferida para um novo tubo de vidro, ao qual se adicionou água para a remoção dos liso-fosfolípidos (Figura 7D). Posteriormente, agitou-se no vortex, centrifugou-se e retirou-se a fase superior para um novo tubo, com sulfato de sódio anidro, para absorver alguma fase aquosa que tenha sido transferida juntamente com a fase orgânica. Os tubos voltaram a ser centrifugados e o solvente foi transferido para um erlenmeyer, previamente tarado e pesado (Figura 7E). Os solventes foram evaporados em evaporador rotativo, a 37°C.

Figura 7. Isolamento de plasmalogénios a partir do extrato lipídico



3.3. Separação de classes lipídicas

A separação de classes lipídicas, a partir dos lípidos totais e dos plasmalogénios isolados, foi efetuada através de SPE, de acordo com a metodologia descrita por Burdge, Wright, Jones e Wootton (2000) e por Pérez-Palacios, Ruiz e Antequera (2007), com as devidas modificações,

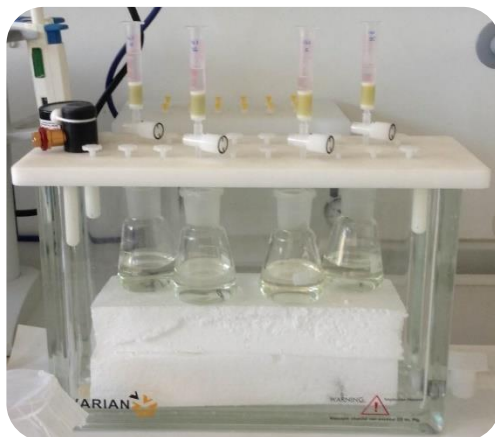
e utilizada pelo Laboratório de Sistemas de Produção Animal (CIISA), da Faculdade de Medicina Veterinária (Anexo IV).

Para as separações utilizou-se um sistema de “SPE vaccum manifold” e colunas de SPE-aminopropil (NH₂), 500 mg/3 mL (Figura 8), e os seguintes eluentes para a obtenção das respectivas classes lipídicas:

Fração	Eluente	Classe lipídica
1	Hexano	Ésteres de colesterol
2	Diclorometano	Mono-, di- e triacilgliceróis
3	Éter dietílico:ácido acético (98:2, v/v)	Ácidos gordos livres
4	Acetonitrilo:isopropanol (2:1, v/v)	Fosfolípidos de colina
5	Metanol	Fosfolípidos de etanolamina
6	iso-propanol:3N HCl 37% em metanol (4:1, v/v)	Fosfolípidos de serina
7	Diclorometano:metanol:HCl 37% (200:100:1, v/v)	Fosfolípidos de inositol

Estas frações foram recolhidas em erlenmeyers, previamente tarados, procedendo-se de seguida à evaporação dos seus solventes em evaporador rotativo, a 37°C.

Figura 8. Cromatografia de extração em fase sólida



3.4. Transesterificação direta

As frações obtidas anteriormente foram transesterificadas em FAME e DMA, pela adição de um catalisador alcalino seguido de um catalisador ácido em metanol, tal como na metodologia descrita por Alves, Santos-Silva, Cabrita, Fonseca e Bessa (2013), com as devidas modificações, e utilizada pelo Laboratório de Sistemas de Produção Animal (CIISA), da Faculdade de Medicina Veterinária (Anexo V).

Resumidamente, adicionou-se tolueno e uma quantidade conhecida de padrão interno, C19:0 (1 mg/mL hexano), a cada uma das frações lipídicas obtidas. Posteriormente adicionou-se uma solução de metóxido de sódio em metanol (0,5 M), agitou-se no vortex e colocou-se 10 minutos em banho-maria a 50°C, para reagir. Depois de arrefecido à temperatura ambiente, adicionou-

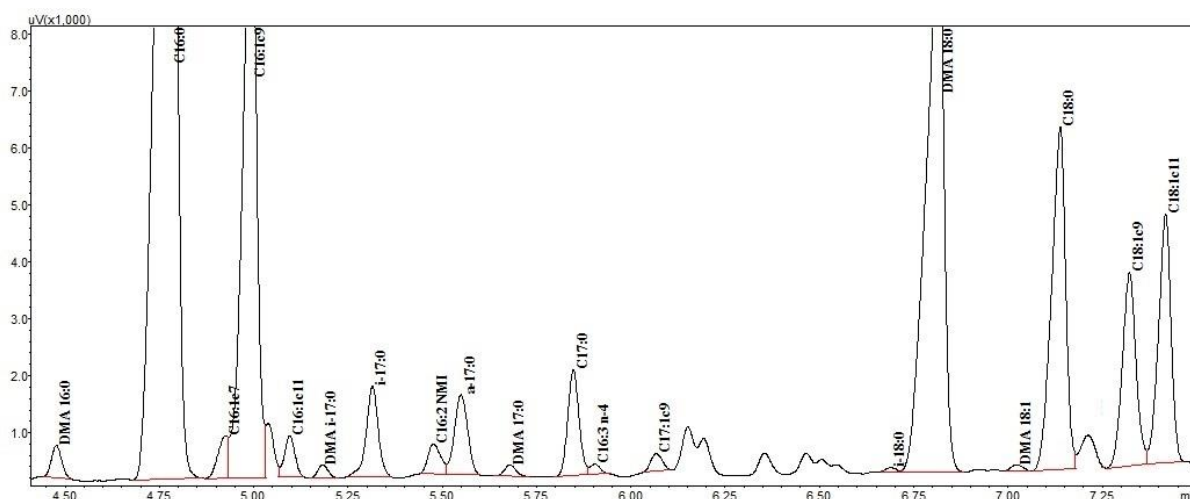
se uma solução 10% HCl em metanol, agitou-se novamente no vortex e colocou-se em banho-maria por mais 10 minutos, a 80°C. Depois de arrefecido, foi adicionado, em duas porções, solução de carbonato de potássio, de modo a prevenir efervescência excessiva, seguido da adição de hexano, para a extração dos ácidos gordos. Os tubos foram agitados no vortex, centrifugados, e a fase orgânica superior, foi transferida para um novo tubo, que continha sulfato de sódio anidro, para absorver alguma fase aquosa que seja transferida juntamente com a fase orgânica. A extração com hexano repetiu-se uma vez mais. Os tubos onde se encontrava a fase orgânica (hexano) foram centrifugados, e o solvente transferido para um novo tubo, que foi depois evaporado em corrente de azoto, a 37°C. O resíduo que permaneceu foi depois dissolvido com hexano para GC, colocado em viais de GC e armazenados a -23°C para futura análise.

3.5. Análise por cromatografia gasosa

Para a determinação da composição de FAME e DMA de cada fração lipídica recorreu-se à técnica da cromatografia gasosa com deteção por ionização de chama (GC-FID), utilizando-se um equipamento GC-2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com uma coluna capilar de sílica-fundida (SupraWax, 10 m × 0,10 mm diâmetro interno × 0,10 µm espessura de fase estacionária, Teknokroma, Barcelona, Espanha). Durante a análise o injetor e o detetor foram mantidos a 250°C e 280°C, respetivamente. Utilizou-se hélio como gás de arraste a fluxo constante de 0,34 mL/minuto e foi injetado 1 µL de amostra. A temperatura do forno foi programada para iniciar a 120°C, aumentou a 35°C/minuto até aos 175°C (mantido durante 2 minutos), aumentou a 5°C/minuto até aos 260°C, onde foi mantida durante 20 minutos (Figura 9).

Também se recorreu à cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), para a identificação dos FAME e DMA utilizando-se um equipamento GCMS – QP2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com coluna capilar (SP-2560, 100 m × 0,25 mm diâmetro interno × 0,20 µm espessura da fase estacionária, Supelco, Bellefonte, PA, USA). Durante a análise o injetor foi mantido a 250°C e utilizou-se hélio como gás de arraste a fluxo constante de 1 mL/minuto. A temperatura do forno foi programada para iniciar a 50°C (mantida durante 1 minuto), aumentou a 50°C/minuto até aos 150°C (mantida durante 20 minutos), aumentou a 1°C/minuto até aos 190°C, e finalmente, aumentou a 2°C/minuto até aos 220°C onde foi mantida durante 30 minutos. As temperaturas da fonte de ionização e da interface do espectrómetro de massa foram 200°C e 240°C, respetivamente.

Figura 9. Cromatograma parcial dos ácidos gordos referente à fração lipídica total de uma amostra de mexilhão



4. Quantificação de FAME e DMA

A quantificação do total de FAME e DMA dos lípidos totais e das frações lipídicas foram determinadas recorrendo ao método do padrão interno, utilizando o ácido nonadecanóico (C19:0) como padrão. Assim, permitiu estabelecer uma relação entre a área do pico do padrão interno com a dos FAME e DMA identificados, levando então à sua quantificação. A composição em ácidos gordos e DMA de cada classe lipídica foi expressa em percentagem do total de ácidos gordos e DMA, respetivamente.

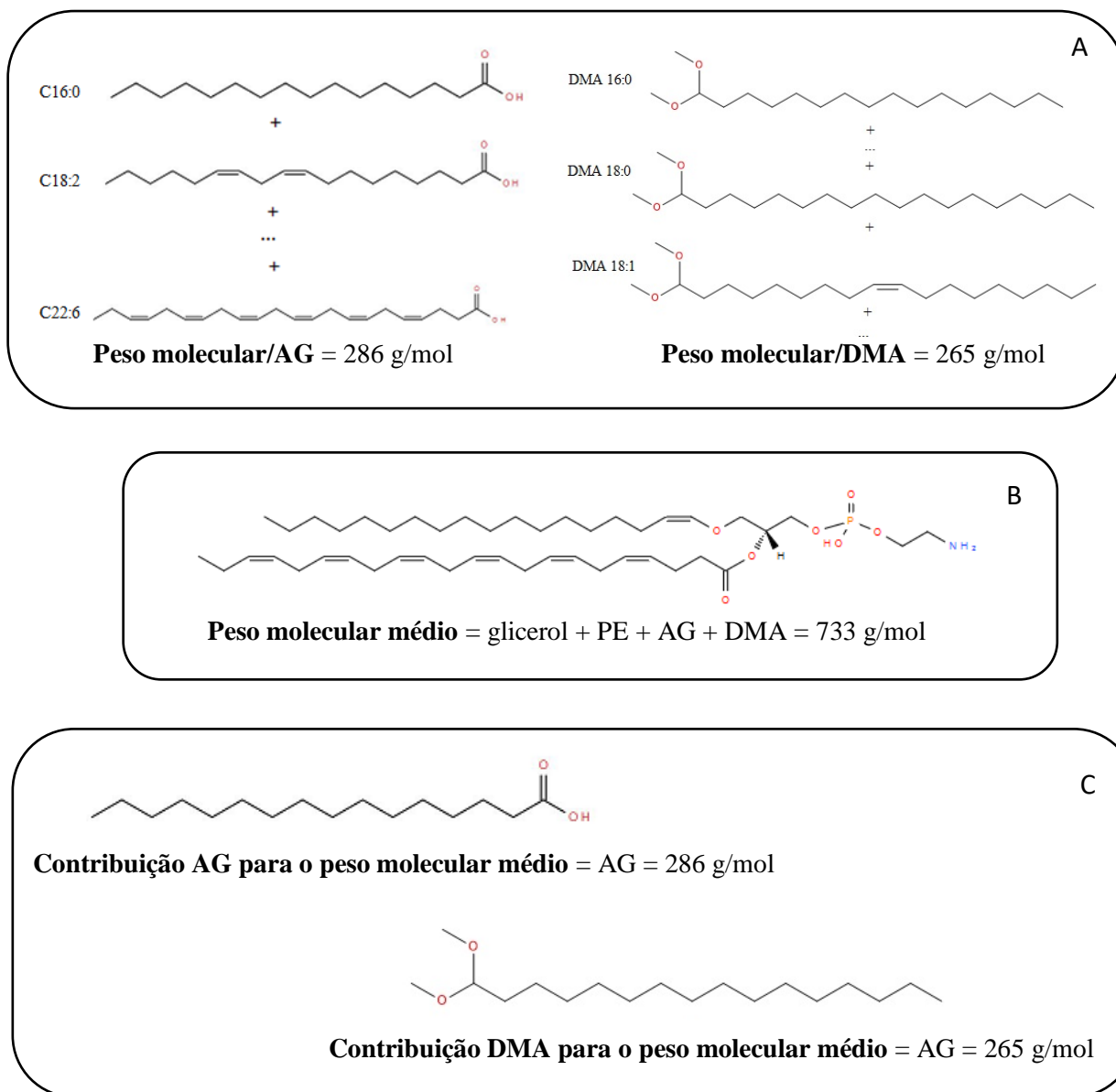
5. Determinação de fatores de conversão de ácidos gordos e dimetilacetais

Os fatores de conversão correspondem à relação entre a contribuição dos ácidos gordos e/ou DMA para o peso molecular médio da molécula/fração em estudo, e entre o peso molecular médio dessa mesma molécula/fração. Assim, para a sua determinação, numa primeira instância, procedeu-se ao cálculo do peso molecular médio por ácido gordo e/ou DMA presentes na fração em estudo de acordo com o exemplo da molécula de plasmeniletanolamina na Figura 10A. Depois de este estar determinado, procedeu-se ao cálculo do peso molecular médio da molécula, através da sua reconstituição (Figura 10B). No exemplo da molécula de plasmeniletanolamina, composta por uma molécula de glicerol, etanolamina no grupo fosfato, um ácido gordo e um DMA, o seu peso molecular médio, seria, então, correspondente à soma do peso molecular dos componentes mencionados atrás. Por último, determinou-se a contribuição dos ácidos gordos e/ou DMA para o peso molecular médio da molécula/fração (Figura 10C). Sendo a plasmeniletanolamina composta por um ácido gordo e um DMA, determinou-se, então, a sua contribuição para o peso molecular médio da molécula/fração em estudo. Neste caso, foi determinado pela soma dos pesos moleculares médios dos ácidos gordos e DMA presentes na

molécula. Por fim é possível determinar os fatores de conversão para cada classe ou subclasse lipídica em estudo através da seguinte fórmula:

$$\text{Fatores de conversão (g /g lípidos)} = \frac{\text{contribuição AG e/ou DMA peso molecular médio}}{\text{peso molecular médio}}$$

Figura 10. Exemplo da determinação de fatores de conversão lipídicos da plasmeniletanolamina

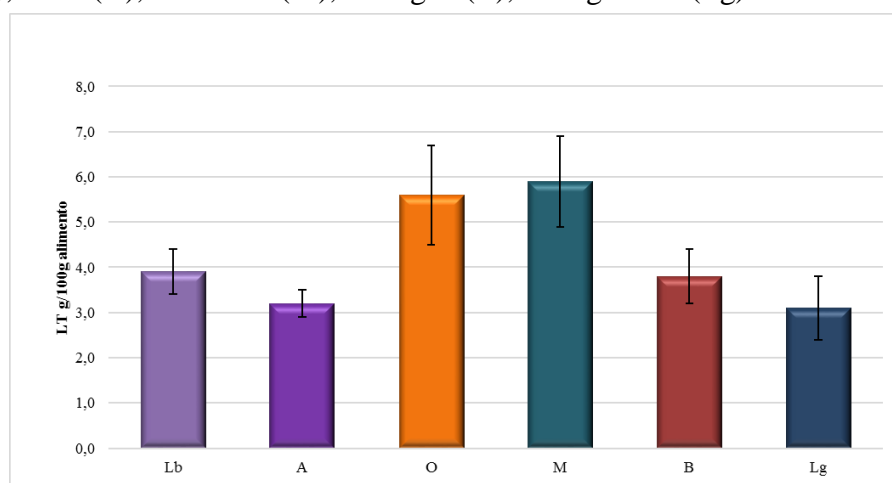


Capítulo 3: Resultados

1. Composição lipídica dos bivalves

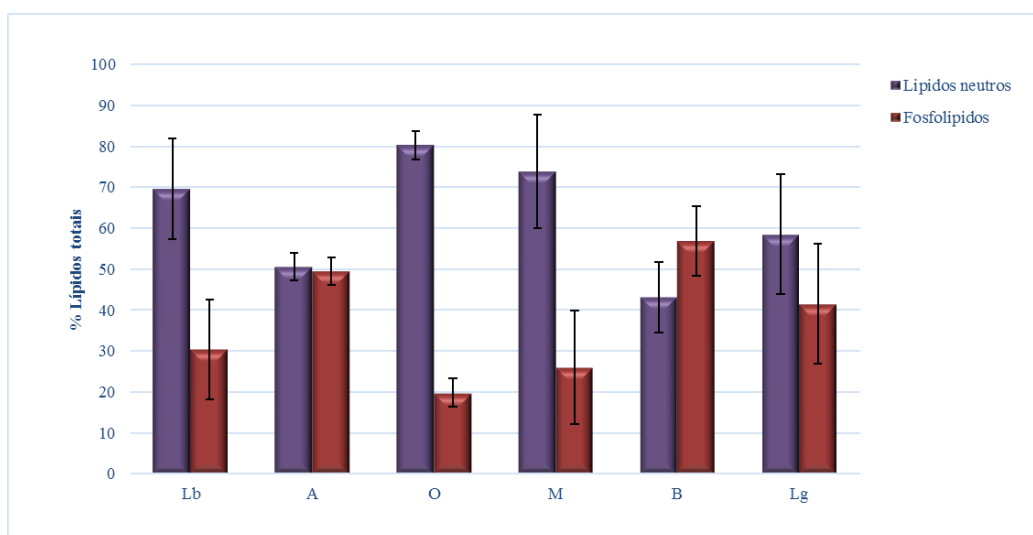
O teor em lípidos totais dos bivalves analisados variou entre 3,1 e 5,9 g/100g alimento, correspondendo o menor valor ao longueirão e o maior ao mexilhão. A lambujinha, a ameijoia, a ostra e o berbigão apresentaram, respetivamente, 3,9 g/100g alimento, 3,2 g/100g alimento, 5,6 g/100g alimento e 3,8 g/100g alimento (Gráfico 1). Estes bivalves apresentam teores médios de humidade de 62,4%, 61,7%, 64,9%, 65,8%, 66,0% e 67,0%, correspondendo à lambujinha, ostra, ameijoia, mexilhão, berbigão e longueirão, respetivamente.

Gráfico 1. Composição em lípidos totais (g/100g alimento) dos bivalves: lambujinha (Lb), ameijoia (A), ostra (O), mexilhão (M), berbigão (B), e longueirão (Lg).



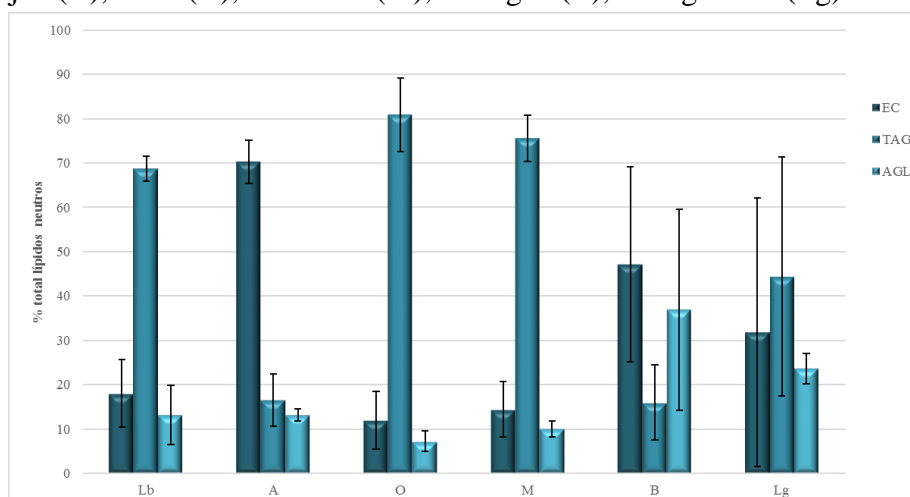
Ao analisar as proporções de lípidos neutros e de fosfolípidos em relação aos de lípidos totais presentes nas amostras (Gráfico 2), o bivalve que apresentou, em média, o valor mais elevado de lípidos neutros foi a ostra, com 80,2% e, o que apresentou menor valor foi o berbigão, com 43,1%. Consequentemente, estes também são os bivalves que apresentaram menor e maior percentagem em fosfolípidos, 19,8% na ostra e 56,9% no berbigão. Os restantes bivalves apresentaram as seguintes proporções em lípidos neutros e fosfolípidos: lambujinha, 69,6% e 30,4%; ameijoia, 50,5% e 49,5%; mexilhão, 73,9% e 26,1%; longueirão, 58,5% e 41,5%, respetivamente.

Gráfico 2. Composição percentual de lípidos neutros e fosfolípidos dos bivalves: lambujinha (Lb), ameijoia (A), ostra (O), mexilhão (M), berbigão (B), e longueirão (Lg).



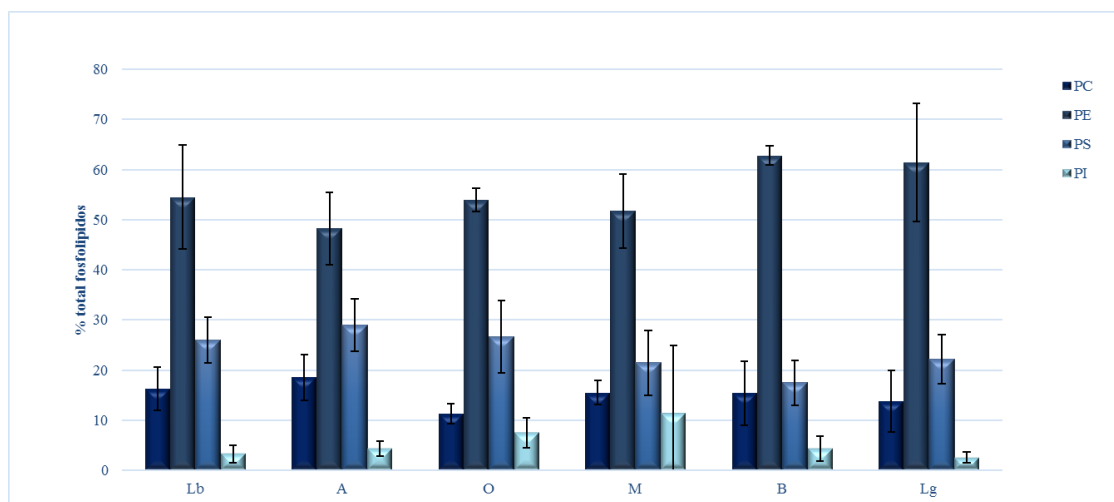
No Gráfico 3 encontram-se as proporções de ésteres de colesterol, triacilgliceróis e de ácidos gordos livres em relação ao total de lípidos neutros em cada espécie de bivalve. Nestes, verificou-se que a percentagem de ésteres de colesterol varia entre 12 e 70,2%, sendo o valor mínimo correspondente à ostra e o máximo à ameijoia. Por sua vez, o mexilhão apresenta 14,4% de ésteres de colesterol, a lambujinha 18,1%, o longueirão 31,9% e o berbigão 47,1%. Em relação aos triacilgliceróis, as proporções variam entre 16,0 e 80,8%, sendo estes referentes ao berbigão e à ostra. Os restantes bivalves, ameijoia, longueirão, lambujinha e mexilhão, apresentam, respetivamente, 16,6%, 44,5%, 68,7% e 75,5%. No que diz respeito aos ácidos gordos livres, a ostra apresenta a menor percentagem (7,2%) e o berbigão a maior (36,9%). Entre estes encontram-se o mexilhão com 10,1%, a lambujinha e a ameijoia, ambos com 13,2%, e o longueirão com 23,6%.

Gráfico 3. Composição percentual das classes lipídicas de lípidos neutros (LN): ésteres de colesterol (EC), triacilgliceróis (TAG) e ácidos gordos livres (AGL) dos bivalves: lambujinha (Lb), ameijoia (A), ostra (O), mexilhão (M), berbigão (B), e longueirão (Lg).



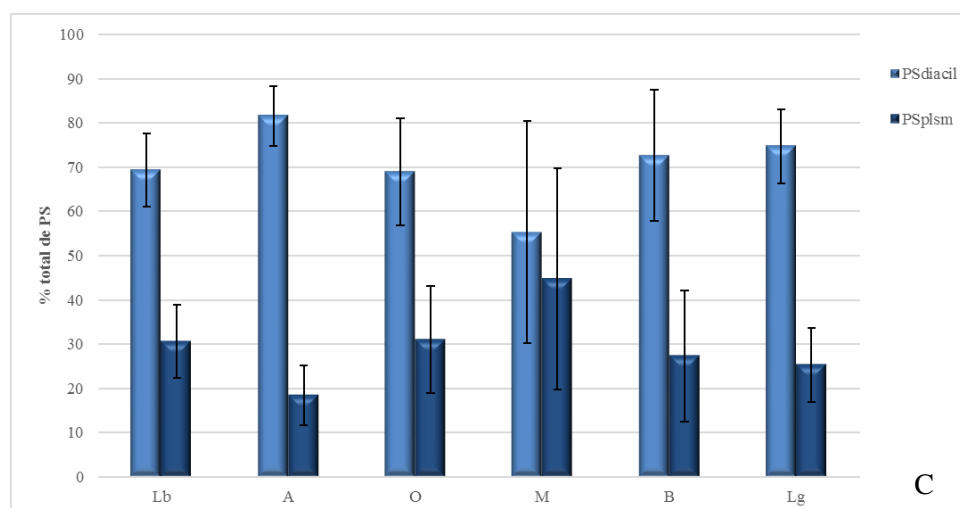
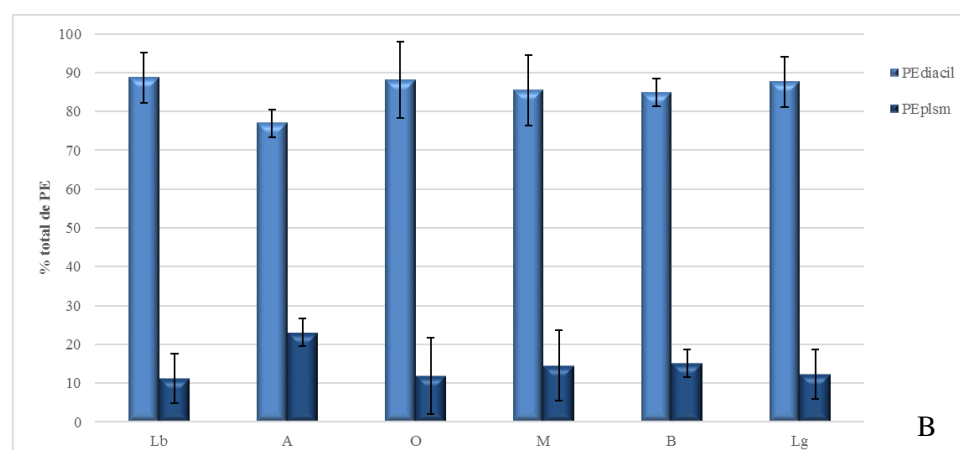
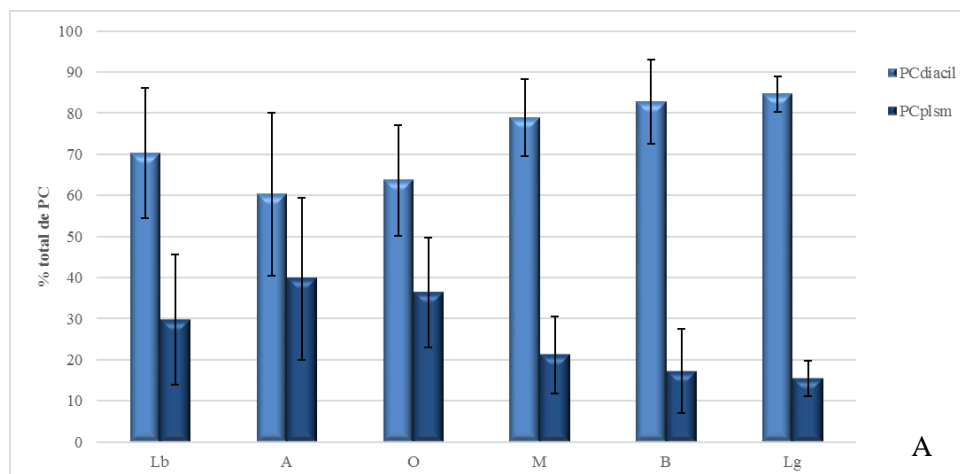
No que diz respeito às proporções das classes lipídicas dos fosfolípidos de colina (PC), etanolamina (PE), serina (PS) e inositol (PI), em relação ao total de fosfolípidos presentes nas amostras (Gráfico 4), o PE é aquele que se encontra, em todas as amostras, em maior quantidade, sendo seguido pelo PS, PC e, por último, com a menor percentagem registada, o PI. Dentro do PE, este apresentou proporções que variam entre 48,2 e 62,8%, correspondentes à ameijoia e ao berbigão, respetivamente. O longueirão, a lambujinha, a ostra e o mexilhão apresentaram as seguintes percentagens: 61,5%, 54,5%, 54,6% e 51,7%. O PS apresentou percentagens entre 21,4% (mexilhão) e 29,0% (ameijoia). A ostra, a lambujinha, o longueirão e o berbigão apresentaram, respetivamente, estas percentagens: 26,7%, 26,0%, 22,2% e 17,5%. Quanto ao PC, este apresentou valores que variam entre 11,3 e 18,5%, referentes à ostra e à ameijoia. As restantes amostras, lambujinha, mexilhão, berbigão e longueirão apresentaram as seguintes percentagens: 16,3%, 15,5%, 15,4% e 13,8%. Por último, o PI, a classe lipídica que apresentou uma menor proporção, está compreendida entre 2,6% (longueirão) e 11,3% (mexilhão). A ostra, a ameijoia, o berbigão e a lambujinha apresentaram, respetivamente, proporções na ordem dos 7,5%, 4,3%, 4,3% e 3,3%.

Gráfico 4. Composição percentual das classes dos fosfolípidos de colina (PC), etanolamina (PE), serina (PS) e inositol (PI) dos bivalves: lambujinha (Lb), ameijoia (A), ostra (O), mexilhão (M), berbigão (B), e longueirão (Lg).



A relação entre as proporções das subclasses lipídicas fosfatidilcolina (PC_{diacil}) e plasmênilcolina (PC_{plsm}), fosfatidiletanolamina (PE_{diacil}) e plasmêniletanolamina (PE_{plsm}) e fosfatidilserina (PS_{diacil}) e plasmênilserina (PS_{plsm}) encontram-se nos Gráficos 5A, 5B e 5C, respetivamente. Assim, pela análise do mesmo, verificou-se que a subclasse referente aos diacil-glicerofosfolípidos é superior aos plasmalogénios, em todas as amostras analisadas.

Gráfico 5. Composição percentual das classes de fosfolípidos diacil e plasmalogenios (plsm) de: A - colina (PC), B - etanolamina (PE) e C - serina (PS) dos bivalves: lambujinha (Lb), ameijoia (A), ostra (O), mexilhão (M), berbigão (B), e longueirão (Lg).



Dentro dos plasmalogénios, a amostra que, de um modo geral, mostrou conter maior proporção em plasmalogénios foi a ameijoia, sendo seguida pelo mexilhão e, depois, pela ostra, lambujinha, berbigão, e por último, com a menor proporção de plasmalogénios, o longueirão. Analisando individualmente cada subclasse de plasmalogénios, as percentagens de PC_{plsm} variam entre 15,4 e 39,7%, referentes ao longueirão e à ameijoia. As restantes amostras, ostra, lambujinha, mexilhão e berbigão, apresentam, respetivamente, percentagens na ordem dos 36,4%, 29,7%, 21,2% e 17,3% (Gráfico 5A). As percentagens de PE_{plsm} variam entre 11,3% (lambujinha) e 23,1% (ameijoia), sendo as seguintes, 15,1%, 14,6%, 12,4% e 11,9%, referentes ao berbigão, mexilhão, longueirão e ostra (Gráfico 5B). Por último, as percentagens de PS_{plsm} encontra-se entre 18,4% (ameijoia) e 44,7% (mexilhão). As restantes amostras apresentam as seguintes percentagens: 31,1% para a ostra, 30,6% para a lambujinha, 27,4% para o berbigão e 25,3% para o longueirão (Gráfico 5C). Pelo contrário, se for analisado cada classe lipídica relativamente à proporção de plasmalogénios, verificou-se que, de um modo geral, a subclasse lipídica PS_{plsm} é predominante na maioria das amostras, nomeadamente na lambujinha, mexilhão, berbigão e longueirão. No entanto, na ostra e na ameijoia, a subclasse que predomina é o PC_{plsm} . Pelo contrário, a subclasse referente aos plasmalogénios que se encontra em menor quantidade na maioria das amostras analisadas é o PE_{plsm} . A única exceção é a ameijoia, no qual o PS_{plsm} é que se encontra em menor quantidade.

A informação representada nos Gráficos 1, 2, 3, 4 e 5 encontram-se sob a forma de tabela no Anexo VI.

2. Composição de ácidos gordos das classes de fosfolípidos

A composição em ácidos gordos das classes lipídicas PC, PE e PS, que inclui tanto fosfolípidos diacil como plasmalogénios, das amostras em estudo encontram-se, respetivamente, nas Tabelas 4, 5 e 6.

No que respeita ao PC (Tabela 4), todas as amostras estudadas, exceto a ameijoia, apresentam maior proporção em SFA, sendo depois seguida pelos PUFA, e por último pelos MUFA. No caso da ameijoia, esta é mais rica em PUFA, sendo seguida pelos SFA, e por último, tal como nas restantes amostras, pelos MUFA.

Dentro dos SFA, a percentagem mais elevada (63,6%) corresponde à lambujinha, e a mais reduzida (39,2%) à ameijoia. Os restantes bivalves apresentam os seguintes valores: 52,2% (mexilhão), 47,4% (berbigão), 46,0% (longueirão) e 45,5% (ostra). Ainda respeitante a este grupo de ácidos gordos, verificou-se que, em todas as amostras estudadas, os ácidos gordos

predominantes foram o C16:0 (20,8 – 32,7%), seguido pelo C18:0 (8,1 – 16,8%). No que respeita aos MUFA, as percentagens variaram entre 10,3 e 20,7%, para o berbigão e longueirão, e para a ameijoa, respetivamente. Para as restantes amostras as percentagens foram 13,5% para a lambujinha, 13,2% para a ostra e 12,5% para o mexilhão. Dentro deste grupo de ácidos gordos, o ácido gordo predominante foi o C18:1c9 (3,2 – 10,8%) para todas as amostras, exceto no berbigão, cujo ácido gordo predominante foi o C16:1c9 (2,8%). Em relação aos PUFA, as proporções encontram-se entre 19,3 e 41,1%, correspondentes à lambujinha e ao longueirão. Para o berbigão, ameijoa, ostra e mexilhão os ácidos gordos polinsaturados representam, respetivamente, 40,2%, 39,6%, 32,9% e 32,4%. Neste grupo de ácidos gordos, na ameijoa, mexilhão, berbigão e longueirão, o ácido gordo predominante é o DHA (10,5 – 18,0%). Contudo, no mexilhão e no berbigão o EPA também se encontra presente de forma significativa (7,4 e 10,1%). Na ameijoa e no longueirão as proporções deste ácido gordo, apesar de menores que nas amostras mencionadas anteriormente (4,2 e 3,6%), também se destacam dos restantes PUFA. Tal como o C18:4 se destaca na lambujinha (4,8%).

Relativamente ao PE (Tabela 5), com exceção da lambujinha, todas as amostras analisadas apresentaram maior percentagem em PUFA, sendo seguida pelos SFA, e por último pelos MUFA. No caso da lambujinha esta é mais rica em SFA, sendo seguida pelos MUFA, e é menos rica em PUFA.

Dentro dos SFA, a proporção mais elevada (36,9%) corresponde à lambujinha, e a mais reduzida (28,6%) ao longueirão. Os restantes bivalves apresentam os seguintes valores: 35,8% (mexilhão), 32,3% (berbigão), 31,2% (ostra) e 29,0% (ameijoa). Ainda respeitante a este grupo de ácidos gordos, verificou-se que, em todas as amostras estudadas, os ácidos gordos predominantes foram o C16:0 (16,8 – 23,7%), seguido pelo C18:0 (5,1 – 7,4%). No que respeita aos MUFA, as percentagens variaram entre 12,2 e 33,8%, para o berbigão e para a lambujinha, respetivamente. Para as restantes amostras os valores foram 17,2% para a ameijoa, 15,4% para a ostra, 14,2% para o longueirão e 14,1% para o mexilhão. Dentro deste grupo de ácidos gordos, os que se destacaram foram o C18:1c9, na lambujinha, ameijoa e longueirão (7,7%, 7,1% e 5,2%). Também na lambujinha, o C20:1n-9 (7,1%) e C20:1n-13 (5,9%) se mostraram proeminentes. Na ostra, foram o C18:1c11 (4,0%) e o C20:1n-7 (3,4%) que dominaram. Em relação aos PUFA, as percentagens encontram-se entre 15,9 e 52,0%, correspondentes à lambujinha e ao longueirão. Para a ameijoa, berbigão, ostra e mexilhão os PUFA representam, respetivamente, 51,8%, 51,7%, 44,9% e 44,5%. Neste grupo de ácidos gordos, em todas as amostras, exceto a lambujinha, o ácido gordo predominante é o DHA (12,0 – 17,8%). Contudo, na ostra, mexilhão, berbigão, bem como no longueirão, o EPA também se encontra presente de

forma significativa (9,8%, 12,7%, 10,0% e 7,8%). Na lambujinha, o EPA destaca-se ligeiramente (2,8%). Na ameijoia e na ostra, também se dá destaque ao C22:2 Δ 7,15 (5,5 e 6,8%).

Tabela 4. Teor em ácidos gordos totais (mg/g amostra) e composição em ácidos gordos (% do total de ácidos gordos) dos fosfolípidos de colina (PC) – diacil e plasmalogénios.

	Lambujinha	Ameijoia	Ostra	Mexilhão	Berbigão	Longueirão
Total AG	0,37 \pm 0,093	0,73 \pm 0,186	0,62 \pm 0,328	0,96 \pm 0,623	0,72 \pm 0,265	0,49 \pm 0,288
C12:0	0,4 \pm 0,24	0,2 \pm 0,04	0,1*	0,3 \pm 0,14	n.d.	0,2 \pm 0,01
C14:0	2,1 \pm 0,96	1,4 \pm 0,90	1,5 \pm 0,31	1,8 \pm 0,79	3,5 \pm 1,41	4,3 \pm 1,32
i-C15:0	0,3 \pm 0,06	0,2 \pm 0,16	0,3 \pm 0,38	0,2*	0,2 \pm 0,17	0,2*
a-C15:0	1,4 \pm 1,47	0,2 \pm 0,09	0,7*	1,1 \pm 1,34	0,1*	0,6 \pm 0,22
C15:0	4,7 \pm 2,71	0,9 \pm 0,37	1,1 \pm 0,50	0,9 \pm 0,21	1,2 \pm 0,49	1,4 \pm 0,56
i-C16:0	0,5 \pm 0,13	1,2 \pm 0,50	0,6 \pm 0,39	0,3 \pm 0,16	0,6 \pm 0,14	0,5 \pm 0,07
C16:0	32,7 \pm 7,34	20,8 \pm 2,91	21,6 \pm 7,42	30,8 \pm 1,27	27,6 \pm 5,42	27,2 \pm 8,97
i-C17:0	1,2 \pm 0,29	1,0 \pm 0,27	1,0 \pm 0,25	1,1 \pm 0,19	1,3 \pm 0,68	0,7 \pm 0,41
a-C17:0	0,6 \pm 0,04	0,2*	1,2 \pm 0,88	0,9 \pm 1,15	0,3 \pm 0,21	0,5 \pm 0,33
C17:0	2,2 \pm 0,10	1,4 \pm 0,28	2,0 \pm 0,75	1,9 \pm 1,02	2,5 \pm 1,45	1,6 \pm 0,55
i-C18:0	n.d.	n.d.	1,5 \pm 1,65	0,2*	0,2 \pm 0,03	0,2*
C18:0	16,8 \pm 4,90	11,4 \pm 1,03	13,5 \pm 2,96	12,3 \pm 2,43	9,4 \pm 4,82	8,1 \pm 2,99
C20:0	0,8 \pm 0,53	0,2 \pm 0,07	0,3 \pm 0,39	0,4 \pm 0,06	0,4 \pm 0,32	0,4 \pm 0,00
C16:1c7	0,3 \pm 0,17	0,4 \pm 0,17	0,7*	0,3 \pm 0,20	0,1*	0,4*
C16:1c9	1,3 \pm 0,99	1,8 \pm 0,49	1,5 \pm 0,92	2,1 \pm 1,07	2,8 \pm 1,41	1,9 \pm 0,61
C17:1c9	1,1 \pm 0,34	0,4 \pm 0,29	0,1*	0,2 \pm 0,08	0,3 \pm 0,12	0,4 \pm 0,23
C18:1c9	5,5 \pm 7,25	10,8 \pm 3,39	4,3 \pm 0,91	4,5 \pm 4,22	2,4 \pm 0,80	3,2 \pm 2,00
C18:1c11	2,0 \pm 2,92	4,6 \pm 2,17	2,6 \pm 1,12	2,3 \pm 0,52	2,3 \pm 1,01	2,4 \pm 0,36
C20:1n-13	0,6 \pm 0,14	1,2 \pm 0,37	1,0*	0,6 \pm 0,03	0,5 \pm 0,17	0,6 \pm 0,37
C20:1n-9	0,8 \pm 0,24	0,9 \pm 0,00	0,4 \pm 0,27	1,6 \pm 0,38	0,8 \pm 0,56	0,7 \pm 0,47
C20:1n-7	0,6 \pm 0,24	0,5 \pm 0,25	2,5 \pm 2,63	0,9*	0,9 \pm 0,09	0,6 \pm 0,45
C22:1	1,3 \pm 1,22	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C16:2 NMI	0,3*	1,1 \pm 0,26	0,7 \pm 0,16	0,2 \pm 0,101	0,7 \pm 0,25	0,4 \pm 0,29
C16:2n-4	0,8 \pm 0,77	n.d.	0,7 \pm 0,32	n.d.	n.d.	0,4*
C16:3n-4	n.d.	0,3*	0,1*	n.d.	0,9*	0,2*
C18:2n-6	4,7*	3,1 \pm 1,43	1,8 \pm 0,80	1,1 \pm 0,83	0,6 \pm 0,34	0,8 \pm 0,76
C18:3n-3	0,8 \pm 0,36	0,4*	1,2 \pm 1,12	0,6 \pm 0,04	0,2*	0,6 \pm 0,58
C18:4	4,8 \pm 0,59	3,1 \pm 0,56	3,0 \pm 1,60	3,8 \pm 1,78	2,2 \pm 0,85	2,7 \pm 0,69
C20:2 Δ5,11	n.d.	n.d.	n.d.	1,1 \pm 0,01	n.d.	n.d.
C20:2 Δ5,13	n.d.	n.d.	1,0 \pm 0,73	0,2*	0,2*	0,6*
C20:3n-9	0,4*	0,9*	3,0*	0,5*	0,8 \pm 0,56	n.d.
C20:2n-6	n.d.	1,3 \pm 0,48	1,2 \pm 0,29	0,5*	0,9 \pm 0,37	1,2 \pm 0,70
C20:3 Δ5,11,14	n.d.	n.d.	2,9*	0,1*	0,4 \pm 0,07	0,4*
C20:3n-6	n.d.	n.d.	0,4*	n.d.	0,1*	0,6 \pm 0,07

Tabela 4. (continuação)

	Lambujinha	Ameijoa	Ostra	Mexilhão	Berbigão	Longueirão
C20:4n-6	0,6*	2,0 ± 0,33	0,5 ± 0,05	1,9 ± 0,85	2,8 ± 0,55	1,8 ± 1,24
C20:3n-3	n.d.	n.d.	n.d.	0,8*	0,2*	0,3*
C20:4n-3	1,7*	0,2 ± 0,08	1,3*	n.d.	1,3 ± 1,14	1,0 ± 0,63
C20:5n-3	n.d.	4,2 ± 0,82	1,8 ± 1,60	7,4 ± 0,08	10,1 ± 3,17	3,6 ± 3,15
C22:2 Δ7,13	1,4 ± 0,07	0,9 ± 0,39	1,9 ± 1,83	1,4*	0,7 ± 0,38	0,7 ± 0,05
C22:2 Δ7,15	3,0*	2,9*	3,9 ± 1,33	1,3 ± 1,11	1,6 ± 1,19	0,6 ± 0,22
C21:5n-3	n.d.	0,6*	n.d.	n.d.	0,6 ± 0,34	1,2 ± 0,38
C22:3	n.d.	0,3*	3,8*	0,3*	1,6 ± 0,42	0,8*
Δ7,13,16	n.d.	0,3*	n.d.	0,1*	0,9 ± 0,04	1,6 ± 1,30
C22:4n-6	0,3*	0,9 ± 0,65	n.d.	0,2*	0,9 ± 0,56	1,0*
C22:5n-6	n.d.	0,9 ± 0,37	n.d.	0,5 ± 0,09	1,9 ± 0,23	2,8 ± 0,87
C22:5n-3	n.d.	2,0 ± 0,96	2,2*	10,6 ± 2,98	10,6 ± 9,49	18,0 ± 2,77
C22:6n-3	0,6 ± 0,06	14,6 ± 0,86	1,4 ± 1,46	3,0 ± 0,51	2,1 ± 0,32	2,6 ± 0,76
Outros	3,7 ± 0,34	0,4 ± 0,18	8,5 ± 0,70	52,2 ± 8,68	47,4 ± 7,63	46,0 ± 7,44
Σ SFA	63,6 ± 9,47	39,2 ± 6,13	45,5 ± 6,47	12,5 ± 1,42	10,3 ± 1,06	10,3 ± 1,11
Σ MUFA	13,5 ± 1,58	20,7 ± 3,60	13,2 ± 1,42	32,4 ± 2,59	40,2 ± 2,81	41,1 ± 3,64
Σ PUFA	19,3 ± 1,45	39,6 ± 3,15	32,9 ± 1,24			

Resultados apresentados em média ± desvio padrão, em que n=3

*, valor detetado em apenas uma réplica; n.d., não detetado

Abreviaturas: SFA- ácidos gordos saturados (inclui ramificados); MUFA – ácidos gordos monoinsaturados; PUFA – ácidos gordos polinsaturados; NMI – ácidos gordos não interrompidos com grupos metileno

Em relação ao PS (Tabela 6), apenas a ameijoa e a ostra é que apresentam maior teor em PUFA, sendo depois seguidas pelos SFA e, em último pelos MUFA. As restantes amostras, lambujinha, mexilhão, berbigão e longueirão, são mais ricos em SFA, sendo seguidos pelos PUFA e, depois, pelos MUFA. Contudo, a lambujinha é exceção, no qual os PUFA se encontram em menor quantidade.

Dentro dos SFA, a percentagem mais elevada (57,8%) corresponde ao berbigão, e a mais reduzida (33,6%) à ameijoa. Os restantes bivalves apresentam os seguintes valores: 51,5% (lambujinha), 46,7% (longueirão), 45,6% (mexilhão) e 33,9% (ostra). Ainda respeitante a este grupo de ácidos gordos, verificou-se que, ao contrário das duas classes analisadas anteriormente em todas as amostras estudadas, o ácido gordo predominante é o C18:0 (17,90 – 40,3%), seguido depois pelo C16:0 (7,2 – 14,0%). No que respeita aos MUFA, as proporções variaram entre 12,4 e 27,7%, para o longueirão e para a lambujinha, respetivamente. Para as restantes amostras as proporções foram de 21,1% para a ostra, 20,8% para o mexilhão, 18,4% para a ameijoa e 14% para o berbigão. Dentro deste grupo de ácidos gordos, aqueles que se destacam foram o C20:1n-13 (8,1%) e C18:1c9 (6,4%) na lambujinha; C18:1c9 (5,5%) e C20:1n-13 (5,0%) na ameijoa; C20:1n-7 (9,3%) e C20:1n-13 (5,1%) na ostra; C20:1n-9 (7,5%) e C18:1c9

(4,0%) no mexilhão; e o C20:1n-7 (4,9 e 3,0%) no berbigão e longueirão. Em relação aos PUFA, as percentagens encontram-se entre 12,7 e 44,4%, correspondentes á lambujinha e à ameijoia. Para a ostra, longueirão, mexilhão e berbigão os PUFA representam, respetivamente, 36,7%, 35,4%, 21,1% e 20,9%. Neste grupo de ácidos gordos, apenas a ameijoia e o longueirão apresentaram como ácido gordo predominante o DHA (11,0 e 7,0%). Além deste, na ameijoia, também se destaca o EPA (7,0%) e o C20:4n-6 (AA) (5,3%). No longueirão, também se dá destaque ao EPA (4,5%), C22:2 Δ 7,15 (3,9%) e ao AA (3,6%). Além destes, também o C22:2 Δ 7,13 (4,0%) se destacada na lambujinha, bem como no berbigão (5,3%), no qual, também o C22:2 Δ 7,15 (4,4%) se destaca dos restantes ácidos gordos. Na ostra, o único ácido gordo que predomina é o C22:2 Δ 7,15 (11,0%).

Tabela 5. Teor em ácidos gordos totais (mg/g amostra) e composição em ácidos gordos (% do total de ácidos gordos) dos fosfolípidos de etanolamina (PE) – diacil e plasmalogénios.

	Lambujinha	Ameijoia	Ostra	Mexilhão	Berbigão	Longueirão
Total AG	1,27 \pm 0,404	1,82 \pm 0,506	2,88 \pm 1,481	3,26 \pm 2,224	2,89 \pm 0,308	2,03 \pm 0,399
C12:0	0,1 \pm 0,09	0,1*	0,1 \pm 0,02	0,1 \pm 0,12	0,05 \pm 0,01	0,1 \pm 0,03
C14:0	1,4 \pm 0,34	0,8 \pm 0,37	1,4 \pm 0,65	1,3 \pm 0,32	2,5 \pm 0,46	2,8 \pm 1,58
i-C15:0	0,1 \pm 0,01	0,2 \pm 0,05	0,3 \pm 0,11	0,05 \pm 0,01	0,05 \pm 0,02	0,05 \pm 0,03
a-C15:0	0,5 \pm 0,48	0,2 \pm 0,07	0,1*	0,1 \pm 0,13	0,05*	0,1 \pm 0,03
C15:0	3,8 \pm 1,37	0,7 \pm 0,36	1,3 \pm 0,46	0,7 \pm 0,13	0,8 \pm 0,24	0,9 \pm 0,39
i-C16:0	0,3 \pm 0,07	1,0 \pm 0,26	0,4 \pm 0,13	0,2 \pm 0,11	0,5 \pm 0,12	0,2 \pm 0,07
C16:0	19,5 \pm 2,74	15,9 \pm 4,28	17,9 \pm 4,51	23,7 \pm 4,55	17,5 \pm 4,22	16,6 \pm 4,06
i-C17:0	1,0 \pm 0,47	1,2 \pm 0,33	0,9 \pm 0,36	0,8 \pm 0,14	1,0 \pm 0,14	0,6 \pm 0,45
a-C17:0	0,6 \pm 0,38	0,5*	0,7 \pm 0,21	0,4 \pm 0,07	0,3 \pm 0,19	0,6 \pm 0,30
C17:0	1,8 \pm 0,64	1,4 \pm 0,36	1,7 \pm 0,46	1,7 \pm 0,28	1,7 \pm 0,33	1,0 \pm 0,75
i-C18:0	0,2*	n.d.	0,6 \pm 0,61	0,1 \pm 0,08	0,5 \pm 0,04	0,4 \pm 0,40
C18:0	7,4 \pm 2,05	7,0 \pm 1,96	5,6 \pm 0,73	6,5 \pm 1,74	7,2 \pm 1,78	5,1 \pm 2,60
C20:0	0,2 \pm 0,15	0,1*	0,2 \pm 0,04	0,2 \pm 0,04	0,2 \pm 0,03	0,1 \pm 0,02
C16:1c7	0,1 \pm 0,01	0,3 \pm 0,12	0,2 \pm 0,16	0,3 \pm 0,28	0,1 \pm 0,02	0,1 \pm 0,07
C16:1c9	4,0 \pm 0,36	2,0 \pm 0,33	1,2 \pm 0,52	2,1 \pm 0,74	2,9 \pm 0,53	1,8 \pm 0,27
C17:1c9	2,6 \pm 1,61	0,6 \pm 0,10	0,6 \pm 0,45	0,2 \pm 0,06	0,6 \pm 0,29	0,7 \pm 0,18
C18:1c9	7,8 \pm 1,44	7,1 \pm 1,94	3,3 \pm 1,26	2,5 \pm 1,84	2,0 \pm 0,61	5,2 \pm 2,56
C18:1c11	1,4 \pm 0,58	2,4 \pm 0,67	4,0 \pm 2,62	2,6 \pm 0,73	2,8 \pm 0,07	3,2 \pm 2,02
C20:1n-13	5,9 \pm 5,51	3,0 \pm 0,45	1,6 \pm 0,39	1,4 \pm 0,37	1,6 \pm 0,48	1,3 \pm 0,43
C20:1n-9	7,1 \pm 10,79	1,0 \pm 0,16	1,0 \pm 0,52	2,6 \pm 1,70	0,9 \pm 0,19	0,9 \pm 0,19
C20:1n-7	0,9 \pm 0,27	0,8 \pm 0,09	3,4 \pm 0,07	2,2 \pm 2,19	1,2 \pm 0,08	0,8 \pm 0,26
C22:1	4,2 \pm 2,79	n.d.	n.d.	0,05*	n.d.	0,1 \pm 0,07
C16:2 NMI	0,4*	2,0 \pm 0,42	0,4 \pm 0,06	0,2 \pm 0,10	0,7 \pm 0,04	0,4 \pm 0,16
C16:2n-4	0,4*	n.d.	0,6 \pm 0,68	n.d.	n.d.	0,1*
C16:3n-4	0,2*	0,4 \pm 0,11	0,2 \pm 0,13	0,1 \pm 0,09	0,4 \pm 0,07	0,2 \pm 0,05

Tabela 5. (continuação)

	Lambujinha	Ameijoa	Ostra	Mexilhão	Berbigão	Longueirão
C18:2n-6	1,1 ± 0,70	1,5 ± 1,09	1,2 ± 0,54	1,7 ± 0,72	0,9 ± 0,30	0,7 ± 0,67
C18:3n-3	0,8 ± 0,08	0,8*	0,9 ± 0,17	0,6 ± 0,04	0,4 ± 0,19	1,6 ± 1,93
C18:4n-3	1,4 ± 1,23	3,9 ± 1,88	1,6 ± 0,57	1,7 ± 0,53	1,1 ± 0,26	1,0 ± 0,12
C20:2 Δ5,11	n.d.	n.d.	0,2 ± 0,03	2,6 ± 3,63	n.d.	n.d.
C20:2 Δ5,13	n.d.	0,05*	0,3 ± 0,18	1,3*	0,1 ± 0,06	0,1 ± 0,09
C20:3n-9	n.d.	0,8 ± 0,03	0,3*	0,2 ± 0,18	0,7 ± 0,20	0,4 ± 0,29
C20:2n-6	n.d.	2,1 ± 0,56	0,3 ± 0,06	0,6 ± 0,01	1,2 ± 0,10	1,5 ± 0,42
C20:3 Δ5,11,14	0,5*	0,1*	n.d.	0,5 ± 0,29	0,2 ± 0,10	0,05 ± 0,01
C20:3n-6	0,2 ± 0,09	n.d.	0,2 ± 0,11	0,1 ± 0,10	0,2 ± 0,02	0,7 ± 0,33
C20:4n-6	1,8 ± 0,64	2,0 ± 0,08	2,8 ± 0,67	2,8 ± 0,54	2,6 ± 0,23	2,0 ± 0,37
C20:3n-3	n.d.	0,05*	n.d.	0,1 ± 0,08	0,1 ± 0,06	0,1*
C20:4n-3	n.d.	0,3 ± 0,08	0,3 ± 0,11	0,3 ± 0,25	0,5 ± 0,12	0,5 ± 0,31
C20:5n-3	2,8 ± 1,43	4,7 ± 0,10	9,8 ± 1,85	12,7 ± 3,86	10,0 ± 1,97	7,8 ± 5,16
C22:2 Δ7,13	0,9 ± 0,10	2,0 ± 0,81	2,2 ± 0,52	0,5 ± 0,32	4,0 ± 0,51	2,9 ± 0,55
C22:2 Δ7,15	0,4*	5,5 ± 1,58	6,8 ± 0,41	1,9 ± 1,67	2,7 ± 0,18	2,8 ± 2,30
C21:5n-3	0,3*	0,9 ± 0,31	0,4 ± 0,17	0,2 ± 0,08	0,7 ± 0,15	1,0 ± 0,51
C22:3 Δ7,13,16	n.d.	1,3 ± 0,32	1,0 ± 0,16	0,9 ± 0,67	4,5 ± 0,77	2,5 ± 0,87
C22:4n-6	1,0*	1,6 ± 0,29	0,7 ± 0,44	0,3 ± 0,06	1,6 ± 0,18	4,0 ± 1,06
C22:5n-6	0,6 ± 0,54	1,3 ± 0,24	1,1 ± 0,69	0,4 ± 0,21	1,3 ± 0,25	1,4 ± 0,01
C22:5n-3	1,1 ± 0,63	2,7 ± 0,41	1,8 ± 0,57	1,3 ± 0,33	2,2 ± 0,05	3,4 ± 0,30
C22:6n-3	2,1 ± 1,05	17,8 ± 2,51	12,0 ± 3,61	13,4 ± 5,06	15,7 ± 0,98	17,0 ± 7,57
Outros	13,3 ± 1,51	2,0 ± 0,42	8,4 ± 1,12	5,7 ± 0,76	3,8 ± 0,83	5,3 ± 1,86
Σ SFA	36,9 ± 5,40	29,0 ± 4,49	31,2 ± 4,88	35,8 ± 6,51	32,3 ± 4,91	28,6 ± 4,55
Σ MUFA	33,8 ± 2,75	17,2 ± 2,20	15,4 ± 1,47	14,1 ± 1,10	12,2 ± 1,00	14,2 ± 1,66
Σ PUFA	15,9 ± 0,76	51,8 ± 3,81	44,9 ± 3,14	44,5 ± 3,60	51,7 ± 3,67	52,0 ± 3,68

Resultados apresentados como média ± desvio padrão, em que n=3

*, valor detetado em apenas uma réplica; n.d., não detetado

Abreviaturas: SFA – ácidos gordos saturados (inclui ramificados); MUFA – ácidos gordos monoinsaturados; PUFA – ácidos gordos polinsaturados; NMI – ácidos gordos não interrompidos com grupos metileno

Relativamente à classe lipídica PI, a sua composição em ácidos gordos não se encontra representada, quer devido ao seu baixo conteúdo relativamente ao total de fosfolípidos, quer devido à baixa representação em ácidos gordos na sua composição, tanto a nível dos fosfolípidos diacil e plasmalogénios (fração total), como apenas a nível dos plasmalogénios. Por este último motivo, mais à frente, também não serão apresentados os dimetilacetais referentes ao PI_{plsm}.

Tabela 6. Teor em ácidos gordos totais (mg/g amostra) e composição em ácidos gordos (% do total de ácidos gordos) dos fosfolípidos de serina (PS) – diacil e plasmalogénios.

	Lambujinha	Ameijoa	Ostra	Mexilhão	Berbigão	Longueirão
Total AG	0,57 ± 0,064	1,08 ± 0,116	1,26 ± 0,590	1,01 ± 0,417	0,79 ± 0,301	0,74 ± 0,259
C12:0	0,1 ± 0,01	0,1*	0,1 ± 0,07	0,3 ± 0,04	0,2*	0,1 ± 0,07
C14:0	2,3 ± 2,47	0,4 ± 0,24	0,5 ± 0,22	1,0 ± 0,78	0,9 ± 0,17	1,0 ± 0,18
i-C15:0	0,2 ± 0,03	0,2 ± 0,02	0,1 ± 0,00	0,1*	0,1 ± 0,04	0,1*
a-C15:0	0,7 ± 0,56	0,1 ± 0,03	0,1*	0,7 ± 0,44	0,3 ± 0,16	0,3 ± 0,01
C15:0	1,4 ± 0,89	0,3 ± 0,14	0,4 ± 0,47	0,4 ± 0,06	0,4 ± 0,13	0,4 ± 0,23
i-C16:0	0,4 ± 0,13	0,4 ± 0,14	0,4*	0,2 ± 0,01	0,4 ± 0,14	0,2 ± 0,05
C16:0	9,3 ± 2,98	7,2 ± 2,06	8,9 ± 3,53	14,0 ± 5,79	8,4 ± 1,58	7,7 ± 2,81
i-C17:0	1,3 ± 0,13	1,9 ± 0,38	1,2 ± 0,49	0,9 ± 0,18	1,1 ± 0,38	0,7 ± 0,24
a-C17:0	0,6 ± 0,18	0,8 ± 0,42	0,7*	2,2 ± 0,14	1,0 ± 0,40	0,9 ± 0,31
C17:0	2,3 ± 0,57	2,0 ± 0,43	2,6 ± 1,20	3,7 ± 0,86	3,9 ± 0,45	2,2 ± 0,48
i-C18:0	0,3 ± 0,19	n.d.	0,7 ± 0,72	0,5*	0,5 ± 0,26	0,2 ± 0,22
C18:0	32,2 ± 4,66	20,0 ± 2,32	17,9 ± 3,49	21,0 ± 1,39	40,3 ± 4,23	32,4 ± 1,63
C20:0	0,6 ± 0,23	0,2*	0,3 ± 0,04	0,5 ± 0,24	0,4 ± 0,11	0,4 ± 0,09
C16:1c7	0,3*	0,1*	0,4*	0,2*	n.d.	n.d.
C16:1c9	1,2 ± 0,21	0,6 ± 0,25	0,6 ± 0,32	0,9 ± 0,34	0,4 ± 0,09	0,6 ± 0,39
C17:1c9	0,9 ± 0,24	0,3 ± 0,00	0,4 ± 0,06	0,6 ± 0,34	0,6 ± 0,56	0,4 ± 0,07
C18:1c9	6,4 ± 6,40	5,5 ± 2,40	2,0 ± 0,56	4,0 ± 3,12	2,1 ± 2,01	2,6 ± 0,34
C18:1c11	0,9 ± 0,46	1,8 ± 0,92	1,4 ± 0,64	1,8 ± 0,33	1,6 ± 0,37	1,1 ± 0,27
C20:1n-13	8,1 ± 7,16	5,0 ± 0,82	5,1 ± 0,67	1,6 ± 0,36	2,0 ± 0,90	2,5 ± 1,92
C20:1n-9	3,4 ± 4,25	2,9 ± 0,38	1,4 ± 0,49	7,5 ± 2,31	2,5 ± 0,75	2,3 ± 1,42
C20:1n-7	3,5 ± 1,00	2,4 ± 0,54	9,3 ± 0,73	1,2 ± 0,82	4,9 ± 0,65	3,0 ± 1,75
C22:1	3,1 ± 1,87	n.d.	0,6*	3,0*	n.d.	n.d.
C16:2 NMI	0,7*	1,1 ± 0,25	0,6 ± 0,63	0,2 ± 0,08	0,4 ± 0,11	0,4 ± 0,15
C16:2n-4	0,2*	n.d.	0,7 ± 0,65	n.d.	0,2*	0,8*
C16:3n-4	0,2*	0,3 ± 0,15	n.d.	0,7*	0,2*	0,3*
C18:2n-6	1,8 ± 2,05	0,8 ± 0,29	0,6 ± 0,39	1,3 ± 0,74	1,4 ± 0,55	0,9 ± 1,10
C18:3n-3	0,7 ± 0,32	0,2*	0,2*	0,7 ± 0,47	n.d.	1,0 ± 1,63
C18:4	1,0 ± 0,66	1,2 ± 0,45	2,3 ± 1,58	2,2 ± 0,18	0,8 ± 0,18	1,3 ± 0,23
C20:2 Δ5,11	n.d.	n.d.	0,2 ± 0,10	2,3 ± 0,60	n.d.	n.d.
C20:2 Δ5,13	n.d.	n.d.	0,4 ± 0,24	0,7 ± 0,28	0,4*	0,2*
C20:3n-9	0,1*	0,7 ± 0,44	1,9*	1,6*	0,4 ± 0,11	0,5 ± 0,24
C20:2n-6	n.d.	1,7 ± 0,31	1,2 ± 0,08	0,3 ± 0,22	1,2 ± 0,64	1,4 ± 0,28
C20:3 Δ5,11,14	0,5 ± 0,22	0,3*	n.d.	0,4 ± 0,17	0,4*	0,2 ± 0,10
C20:3n-6	0,05*	n.d.	0,4*	n.d.	n.d.	0,4*
C20:4n-6	0,8 ± 0,36	5,3 ± 0,69	2,5 ± 1,35	0,8 ± 0,81	1,2 ± 0,93	3,6 ± 3,90
C20:3n-3	n.d.	1,3*	n.d.	2,0*	n.d.	n.d.
C20:4n-3	n.d.	n.d.	n.d.	1,2 ± 0,78	n.d.	0,8*
C20:5n-3	0,3 ± 0,13	7,0 ± 1,43	3,6 ± 2,71	0,8 ± 0,07	1,5 ± 0,44	4,5 ± 1,87
C22:2 Δ7,13	4,0 ± 2,41	2,7 ± 1,66	3,6 ± 1,26	2,6 ± 1,23	5,3 ± 0,98	2,3 ± 1,34

Tabela 6. (continuação)

	Lambujinha	Ameijoia	Ostra	Mexilhão	Berbigão	Longueirão
C22:2 Δ7,15	1,2*	5,5 \pm 1,17	11,0 \pm 2,17	2,8 \pm 1,21	4,4 \pm 0,77	3,9 \pm 4,62
C21:5n-3	0,2*	0,2*	n.d.	0,2*	n.d.	n.d.
C22:3 Δ7,13,16	n.d.	0,7*	0,9*	0,2*	1,4 \pm 0,98	1,8 \pm 0,45
C22:4n-6	n.d.	0,9 \pm 0,22	0,4*	n.d.	0,5*	2,1 \pm 1,14
C22:5n-6	n.d.	1,3 \pm 0,81	2,4*	n.d.	n.d.	0,6 \pm 0,33
C22:5n-3	n.d.	1,9*	0,6 \pm 0,15	n.d.	n.d.	1,6 \pm 1,35
C22:6n-3	0,2 \pm 0,06	11,0 \pm 2,53	3,1 \pm 2,00	n.d.	1,2 \pm 0,62	7,0 \pm 5,04
Outros	9,0 \pm 0,49	4,0 \pm 1,24	8,3 \pm 1,13	12,5 \pm 1,77	7,2 \pm 1,25	5,5 \pm 1,92
Σ SFA	51,5 \pm 8,81	33,6 \pm 5,57	33,9 \pm 5,17	45,6 \pm 6,44	57,8 \pm 11,01	46,7 \pm 8,91
Σ MUFA	27,7 \pm 2,67	18,4 \pm 2,06	21,1 \pm 3,00	20,8 \pm 2,26	14,0 \pm 1,57	12,4 \pm 1,20
Σ PUFA	11,7 \pm 0,91	44,1 \pm 2,80	36,7 \pm 2,35	21,1 \pm 0,92	20,9 \pm 1,36	35,4 \pm 1,73

Resultados apresentados como média \pm desvio padrão, em que n=3

*, valor detetado em apenas uma réplica; n.d., não detetado

Abreviaturas: SFA- ácidos gordos saturados (inclui ramificados); MUFA – ácidos gordos monoinsaturados; PUFA – ácidos gordos polinsaturados; NMI – ácidos gordos não interrompidos com grupos metileno

3. Composição de ácidos gordos das subclasses de plasmalogénios

A composição em ácidos gordos das subclasses de plasmalogénios de colina (PC_{plsm}), etanolamina (PE_{plsm}) e serina (PS_{plsm}) das amostras em estudo encontram-se, respetivamente, nas Tabelas 7, 8 e 9.

No que respeita ao PC_{plsm} (Tabela 7), todas as amostras estudadas apresentam maior percentagem em SFA, sendo depois seguida pelos PUFA, e por último pelos MUFA.

Dentro dos SFA, a proporção mais elevada (77,1%) corresponde ao mexilhão, e a mais reduzida (49,4%) à ameijoia. Ainda respeitante a este grupo de ácidos gordos, verificou-se que, na lambujinha e na ameijoia, os ácidos gordos predominantes são o C16:0 (28,1 e 19,2%), sendo depois seguido pelo C18:0 (25,5 e 18,5%). Contudo, na ostra, mexilhão, berbigão e longueirão a ordem é inversa, o ácido gordo predominante é o C18:0 (27,5 – 42,6%) sendo depois seguido pelo C16:0 (18,2 – 25,6%). No que respeita aos MUFA, as proporções variam entre 7,0 e 19,5%, para o longueirão e para a ameijoia, respetivamente. Dentro deste grupo de ácidos gordos, aquele que foi predominante foi o C18:1c9 (3,6 – 9,5%) para todas as amostras, exceto no berbigão, cujo ácido gordo predominante foi o C18:1c11 (3,1%). Em relação aos PUFA, as proporções encontram-se entre 11,6 e 30,7%, correspondentes ao mexilhão e à ameijoia. Neste grupo de ácidos gordos, apenas na ameijoia e no berbigão é que o DHA predomina (8,5 e 8,4%). Ainda nestas amostras, também se dá destaque para o C18:4 (7,1 e 4,5%), tal como na ameijoia (7,1%). Em menor quantidade, mas mesmo assim sobressaindo entre os restantes ácidos gordos, está

também o EPA, tanto na ameijoia (3,4%) como no berbigão (3,3%). Por sua vez, na lambujinha, o ácido gordo que se destaca é o C18:4 (7,3%). Este último mencionado, também sobressai, em relação aos restantes ácidos gordos, no mexilhão (4,7%) e no longueirão (5,5%).

Tabela 7. Teor em ácidos gordos totais (mg/g amostra) e composição em ácidos gordos (% do total de ácidos gordos) dos plasmalogénios de colina (PC_{plsm}).

	Lambujinha	Ameijoia	Ostra	Mexilhão	Berbigão	Longueirão
Total AG	0,12 ± 0,078	0,31 ± 0,239	0,22 ± 0,149	0,20 ± 0,171	0,10 ± 0,061	0,07 ± 0,050
C12:0	0,2*	0,2*	0,5*	0,6*	0,7*	0,4*
C14:0	2,4 ± 0,32	1,2 ± 0,87	1,8 ± 0,40	2,0 ± 0,20	1,4 ± 0,52	4,0 ± 1,64
i-C15:0	1,3 ± 1,76	3,0 ± 2,54	0,2 ± 0,14	0,2*	0,2 ± 0,09	0,9*
a-C15:0	1,2 ± 1,82	0,5 ± 0,35	0,2 ± 0,06	1,0 ± 0,94	0,8 ± 1,01	0,7 ± 0,52
C15:0	1,7 ± 0,51	0,7 ± 0,58	0,9 ± 0,21	0,8 ± 0,15	1,3 ± 0,77	1,4 ± 0,24
i-C16:0	0,7 ± 0,67	3,1*	0,6*	0,3*	1,2 ± 0,81	0,6*
C16:0	28,2 ± 0,62	19,2 ± 7,77	25,7 ± 2,72	24,8 ± 0,91	18,2 ± 2,59	25,6 ± 6,83
i-C17:0	1,0 ± 0,65	2,2 ± 0,81	1,2 ± 1,01	1,0 ± 0,36	2,5 ± 1,66	1,2 ± 0,62
a-C17:0	0,7 ± 0,43	n.d.	0,4*	1,2 ± 0,38	0,8 ± 0,55	1,7 ± 0,59
C17:0	2,6 ± 1,62	0,8 ± 0,40	2,1 ± 0,16	2,6 ± 1,38	2,0 ± 1,21	4,4 ± 1,01
i-C18:0	n.d.	n.d.	1,1*	n.d.	0,4 ± 0,16	0,6 ± 0,56
C18:0	25,6 ± 1,70	18,5 ± 5,69	30,8 ± 6,63	42,6 ± 6,24	30,1 ± 3,98	27,5 ± 6,15
C20:0	1,4 ± 1,23	n.d.	0,7*	n.d.	0,9 ± 0,16	1,1 ± 0,06
C16:1c7	0,6 ± 0,83	1,5 ± 0,64	1,6*	1,6*	1,3*	n.d.
C16:1c9	1,0 ± 0,91	0,8 ± 0,27	1,0 ± 0,85	1,2 ± 0,56	1,0 ± 0,81	0,7 ± 0,33
C17:1c9	0,2 ± 0,01	n.d.	n.d.	0,2*	0,4*	0,7 ± 0,13
C18:1c9	4,0 ± 6,55	9,5 ± 5,42	4,7 ± 1,94	3,6 ± 4,36	1,5 ± 2,18	4,2 ± 4,97
C18:1c11	0,3 ± 0,15	6,1 ± 8,27	1,9 ± 0,92	2,3 ± 2,11	3,1*	0,8 ± 0,53
C20:1n-13	0,1*	1,2 ± 0,89	0,6 ± 0,28	0,8*	n.d.	0,3*
C20:1n-9	0,7*	0,4*	0,3 ± 0,18	n.d.	n.d.	n.d.
C20:1n-7	0,3 ± 0,07	n.d.	2,0 ± 1,15	n.d.	0,4 ± 0,03	0,5*
C22:1	n.d.	n.d.	n.d.	0,4*	n.d.	n.d.
C16:2 NMI	0,8*	0,6 ± 0,50	0,4*	0,3 ± 0,14	0,7 ± 0,57	1,1 ± 0,79
C16:2n-4	1,4*	n.d.	0,8*	n.d.	n.d.	0,5*
C16:3n-4	0,9*	n.d.	0,2*	n.d.	0,5 ± 0,00	0,8*
C18:2n-6	2,2 ± 3,64	6,4 ± 3,28	1,3 ± 0,62	0,9 ± 0,75	0,4*	2,4 ± 2,32
C18:3n-3	0,05*	n.d.	0,1*	0,8 ± 0,01	n.d.	0,2*
C18:4	7,3 ± 0,15	7,1 ± 5,56	5,7 ± 1,97	4,7 ± 2,12	4,5 ± 1,35	5,5 ± 1,37
C20:2 Δ5,11	n.d.	n.d.	1,1*	n.d.	n.d.	n.d.
C20:2 Δ5,13	n.d.	n.d.	0,5*	n.d.	0,9 ± 0,39	0,7*
C20:3n-9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,9*	n.d.
C20:2n-6	n.d.	n.d.	0,1*	0,5*	n.d.	0,8*
C20:3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,4*	n.d.
Δ5,11,14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,4*	n.d.

Tabela 7. (continuação)

	Lambujinha	Ameijoa	Ostra	Mexilhão	Berbigão	Longueirão
C20:3n-6	0,1*	n.d.	0,4 ± 0,35	n.d.	0,6*	n.d.
C20:4n-6	1,0*	2,0*	0,5*	0,8 ± 0,47	1,3 ± 0,68	n.d.
C20:3n-3	0,4*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C20:4n-3	1,2*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C20:5n-3	n.d.	3,4*	0,3 ± 0,12	n.d.	3,3*	n.d.
C22:2 Δ7,13	1,9*	2,3 ± 2,35	1,0 ± 1,28	0,6*	1,8 ± 0,53	0,4*
C22:2 Δ7,15	3,3*	0,4*	1,6 ± 2,10	1,0 ± 0,03	n.d.	2,7*
C21:5n-3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,6*
C22:3 Δ7,13,16	n.d.	n.d.	0,2*	n.d.	1,5*	n.d.
C22:4n-6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C22:5n-6	n.d.	n.d.	n.d.	0,3*	n.d.	n.d.
C22:5n-3	n.d.	n.d.	0,2*	n.d.	n.d.	n.d.
C22:6n-3	n.d.	8,5*	0,4 ± 0,40	1,8*	8,4*	n.d.
Outros	5,4 ± 0,5	0,4 ± 0,13	7,0 ± 0,56	1,1 ± 0,22	6,5 ± 0,98	6,2 ± 1,75
Σ SFA	66,8 ± 9,68	49,4 ± 6,76	66,1 ± 10,37	77,1 ± 12,89	60,6 ± 9,02	70,0 ± 9,48
Σ MUFA	7,2 ± 1,14	19,5 ± 3,47	12,0 ± 1,48	10,2 ± 1,22	7,7 ± 1,05	7,0 ± 1,30
Σ PUFA	20,6 ± 1,68	30,7 ± 2,65	15,0 ± 1,18	11,6 ± 1,02	25,2 ± 1,97	16,7 ± 1,30
Σ NMI	6,0 ± 1,42	3,3 ± 0,90	4,8 ± 0,57	1,9 ± 0,38	5,3 ± 0,68	5,0 ± 1,03

Resultados apresentados como média ± desvio padrão, em que n=3

*, valor detetado em apenas uma réplica; n.d., não detetado

Total de 7 NMI identificados: C16:2 NMI; C20:2 Δ5,11; C20:2 Δ5,13; C20:3 Δ5,11,14; C22:2 Δ7,13; C22:2 Δ7,15; C22:3 Δ7,13,16

Abreviaturas: SFA- ácidos gordos saturados (inclui ramificados); MUFA – ácidos gordos monoinsaturados; PUFA – ácidos gordos polinsaturados; NMI – ácidos gordos não interrompidos com grupos metileno

Relativamente ao PE_{plsm} das amostras estudadas (Tabela 8), com exceção da lambujinha, todas apresentam maior percentagem em PUFA, sendo seguida pelos SFA, e por último pelos MUFA. A lambujinha é mais rica em SFA, sendo seguida pelos MUFA, e é menos rica em PUFA. Dentro dos SFA, a percentagem mais elevada (36,0%) corresponde à lambujinha, e a mais reduzida (17,7%) ao berbigão. Ainda respeitante a este grupo de ácidos gordos, verificou-se que o ácido gordo predominante foi o C16:0 na ameijoa (13,1%) e no berbigão (6,4%), sendo depois seguido pelo C18:0 (11,0 e 5,8%, respetivamente). Na lambujinha, ostra, mexilhão e longueirão o ácido gordo predominante foi o C18:0 (10,1 – 17,7%), seguido pelo C16:0 (9,5 – 11,6%). No que respeita aos MUFA, as proporções variam entre 6,6 e 30,7%, para a ostra e para a lambujinha, respetivamente. Dentro deste grupo de ácidos gordos, aqueles que se destacaram foram o C18:1c9, na lambujinha (6,5%), ameijoa (13,3%), ostra (2,2%) e, especialmente no longueirão (10,2%). O C20:1n-13 destacou-se no berbigão (2,6%), seguido

também do C18:1c9 (2,2%). No mexilhão o destaque vai para o C20:1n-7 (3,7%), sendo também seguido pelo C18:1c9 (2,7%). Em relação aos PUFA, as proporções encontram-se entre 20,2 e 62,2%, correspondentes à lambujinha e ao berbigão. Neste grupo de ácidos gordos, na ameijoia, ostra, mexilhão, berbigão e longueirão, o ácido gordo predominante é o DHA (9,3 – 19,6%). Contudo, também se destacam outros ácidos gordos. Na ostra, dá-se relevância ao EPA (5,5%), sendo este depois seguido pelo C18:4 (4,8%) e depois pelo C22:2 Δ 7,15 (3,9%). No mexilhão, também se destaca o EPA (5,4%), tal como no berbigão (7,4%). Neste, ainda se destaca o C22:2 Δ 7,13 (6,5%) e o C22:2 Δ 7,15 (5,2%), sendo que, estes dois ácidos gordos, também são representativos no longueirão (4,0 e 3,2%).

Tabela 8. Teor em ácidos gordos totais (mg/g amostra) e composição em ácidos gordos (% do total de ácidos gordos) dos plasmalogénios de etanolamina (PE_{plsm}).

	Lambujinha	Ameijoia	Ostra	Mexilhão	Berbigão	Longueirão
Total AG	0,13 ± 0,036	0,44 ± 0,192	0,23 ± 0,074	0,53 ± 0,636	0,42 ± 0,065	0,22 ± 0,097
C12:0	0,1 ± 0,06	0,2*	0,05*	n.d.	0,1*	0,2*
C14:0	1,4 ± 0,77	0,5 ± 0,40	1,9 ± 1,81	1,2 ± 0,50	0,5 ± 0,25	0,7 ± 0,24
i-C15:0	0,6 ± 1,01	1,6 ± 1,90	0,5 ± 0,58	0,1*	0,4 ± 0,51	0,3 ± 0,37
a-C15:0	0,4 ± 0,27	n.d.	n.d.	0,2 ± 0,04	0,05 ± 0,04	0,2 ± 0,09
C15:0	1,1 ± 0,94	0,2 ± 0,04	0,4 ± 0,14	0,5 ± 0,12	0,4 ± 0,06	0,5 ± 0,25
i-C16:0	0,4 ± 0,05	0,2*	0,5 ± 0,43	0,5 ± 0,24	0,5 ± 0,05	0,4 ± 0,37
C16:0	11,6 ± 9,27	13,1 ± 5,13	10,3 ± 6,36	11,4 ± 4,33	6,4 ± 1,64	9,5 ± 4,99
i-C17:0	0,6 ± 0,04	0,7 ± 0,33	1,0 ± 1,08	0,8 ± 0,32	0,9 ± 0,23	0,6 ± 0,13
a-C17:0	0,3 ± 0,16	n.d.	0,1*	1,6 ± 0,61	0,7 ± 0,59	0,7 ± 0,45
C17:0	1,4 ± 0,94	0,9 ± 0,60	1,3 ± 0,68	1,7 ± 0,11	1,0 ± 0,29	1,4 ± 0,86
i-C18:0	n.d.	1,0*	n.d.	0,4*	1,0 ± 0,20	1,5 ± 2,06
C18:0	17,7 ± 9,12	11,0 ± 4,31	16,7 ± 4,23	14,6 ± 9,80	5,8 ± 2,00	10,1 ± 5,15
C20:0	0,4 ± 0,26	0,1 ± 0,10	1,8 ± 2,41	0,6 ± 0,53	0,1 ± 0,08	0,2 ± 0,02
C16:1c7	0,2*	0,2*	0,4*	0,2 ± 0,14	0,1 ± 0,02	0,1 ± 0,10
C16:1c9	1,9 ± 0,81	0,6 ± 0,16	0,6 ± 0,47	1,9 ± 0,74	2,4 ± 1,41	1,0 ± 0,31
C17:1c9	1,7 ± 1,10	0,8*	0,6 ± 0,37	0,3 ± 0,14	1,1 ± 0,14	1,9 ± 1,49
C18:1c9	6,5 ± 3,41	13,3 ± 5,64	2,2 ± 1,07	2,7 ± 2,05	2,2 ± 0,16	10,2 ± 7,56
C18:1c11	1,6 ± 2,06	1,2 ± 0,47	0,4 ± 0,31	0,9 ± 0,38	2,4 ± 0,42	1,8 ± 1,06
C20:1n-13	5,8 ± 9,52	3,0 ± 0,17	0,7 ± 0,60	1,8 ± 0,24	2,6 ± 0,26	1,4 ± 1,23
C20:1n-9	7,2 ± 12,00	n.d.	0,4 ± 0,09	2,1 ± 1,05	1,0 ± 0,05	0,9 ± 0,82
C20:1n-7	1,3 ± 0,20	n.d.	0,9 ± 0,43	3,7 ± 2,53	1,0 ± 0,13	0,2*
C22:1	4,5*	n.d.	0,4*	0,2*	n.d.	n.d.
C16:2 NMI	0,6*	1,6 ± 0,68	0,2*	0,4 ± 0,14	0,8 ± 0,25	0,6 ± 0,57
C16:2n-4	0,3*	n.d.	1,4*	n.d.	n.d.	0,1*
C16:3n-4	1,4*	0,8*	0,1*	0,2*	0,6 ± 0,65	0,8 ± 0,16
C18:2n-6	1,7 ± 1,83	8,4 ± 5,80	1,9 ± 1,68	1,5 ± 0,91	1,2 ± 0,28	2,0 ± 2,82

Tabela 8. (continuação)

	Lambujinha	Ameijoa	Ostra	Mexilhão	Berbigão	Longueirão
C18:3n-3	0,6 ± 0,18	n.d.	0,2*	4,8 ± 6,00	n.d.	5,3*
C18:4	1,9 ± 1,72	2,4 ± 1,50	4,8 ± 3,16	2,2 ± 1,24	1,7 ± 0,76	0,9 ± 0,54
C20:2 Δ5,11	n.d.	n.d.	0,1 ± 0,01	0,7*	n.d.	n.d.
C20:2 Δ5,13	n.d.	0,1*	0,2*	10,6*	0,1 ± 0,01	0,5*
C20:3n-9	n.d.	0,6*	n.d.	1,6*	1,0 ± 0,53	0,2 ± 0,19
C20:2n-6	0,2*	1,9 ± 0,60	2,5 ± 3,35	0,4 ± 0,03	1,7 ± 0,13	1,6 ± 0,62
C20:3 Δ5,11,14	0,5 ± 0,09	n.d.	0,1*	0,5 ± 0,39	0,3 ± 0,07	0,2*
C20:3n-6	0,4 ± 0,11	n.d.	0,05*	0,2*	0,2 ± 0,07	0,5 ± 0,11
C20:4n-6	1,2 ± 1,01	1,6 ± 0,00	2,1*	1,8 ± 0,94	2,5 ± 0,67	0,9 ± 0,54
C20:3n-3	n.d.	n.d.	0,5*	n.d.	0,1*	0,3*
C20:4n-3	0,3*	n.d.	0,1*	n.d.	0,4 ± 0,12	0,3 ± 0,21
C20:5n-3	1,4 ± 0,89	2,7 ± 1,71	5,5 ± 2,83	5,4 ± 1,67	7,4 ± 1,62	3,2 ± 2,91
C22:2 Δ7,13	1,9*	3,0 ± 2,77	2,6 ± 1,35	1,2 ± 0,90	6,5 ± 2,16	4,0 ± 2,86
C22:2 Δ7,15	1,9*	1,4 ± 1,02	3,9 ± 3,53	3,0 ± 0,96	5,2 ± 1,64	3,2 ± 0,70
C21:5n-3	1,0*	0,4 ± 0,01	2,0 ± 2,82	0,1*	0,8 ± 0,23	0,7 ± 0,74
C22:3 Δ7,13,16	n.d.	0,9*	0,7 ± 0,49	1,1 ± 0,51	6,5 ± 1,92	2,5 ± 1,37
C22:4n-6	0,4*	0,9 ± 0,04	1,2*	0,3*	1,9 ± 0,28	2,2 ± 1,02
C22:5n-6	0,8 ± 0,17	1,9*	1,6*	0,3 ± 0,08	1,6 ± 0,63	1,6 ± 1,97
C22:5n-3	1,1 ± 0,88	1,2 ± 0,46	3,9 ± 2,54	1,0 ± 0,34	2,0 ± 0,52	1,4 ± 1,40
C22:6n-3	2,7 ± 1,13	19,3 ± 7,01	15,4 ± 9,81	9,3 ± 2,61	19,6 ± 9,71	14,3 ± 9,17
Outros	13,1 ± 1,17	2,4 ± 1,01	7,9 ± 0,67	6,4 ± 1,19	7,4 ± 1,93	8,9 ± 3,44
Σ SFA	36,0 ± 5,44	29,5 ± 4,38	34,5 ± 5,03	33,6 ± 4,71	17,7 ± 2,13	26,3 ± 3,49
Σ MUFA	30,7 ± 2,60	19,1 ± 4,52	6,6 ± 0,57	13,7 ± 1,22	12,8 ± 0,90	17,6 ± 3,19
Σ PUFA	20,2 ± 0,75	49,1 ± 4,29	51,0 ± 3,25	46,3 ± 2,89	62,2 ± 4,31	47,3 ± 3,00
Σ NMI	4,8 ± 0,87	7,0 ± 1,13	7,8 ± 1,53	17,3 ± 3,68	19,4 ± 3,16	11,0 ± 1,63

Resultados apresentados como média ± desvio padrão, em que n=3

*, valor detetado em apenas uma réplica; n.d., não detetado

Total de 7 NMI identificados: C16:2 NMI; C20:2 Δ5,11; C20:2 Δ5,13; C20:3 Δ5,11,14; C22:2 Δ7,13; C22:2 Δ7,15; C22:3 Δ7,13,16

Abreviaturas: SFA- ácidos gordos saturados (inclui ramificados); MUFA – ácidos gordos monoinsaturados; PUFA – ácidos gordos polinsaturados; NMI – ácidos gordos não interrompidos com grupos metileno

Em relação ao PS_{plsm} (Tabela 9), só o mexilhão é que apresenta maior proporção em PUFA, sendo depois seguido pelos SFA e, em último pelos MUFA. As restantes amostras, lambujinha, ameijoa, ostra, berbigão e longueirão, são mais ricos em SFA, sendo seguidos pelos PUFA e depois pelos MUFA. Contudo a lambujinha é exceção, no qual os PUFA é que se encontram em menor quantidade.

Dentro dos SFA, a proporção mais elevada (51,2%) corresponde ao longueirão, e a mais reduzida (38,2%) ao mexilhão. Ainda respeitante a este grupo de ácidos gordos, verificou-se que na lambujinha, ameijoia e ostra o ácido gordo dominante é o C16:0 (15,6 – 18,5%), sendo depois seguido pelo C18:0 (12,4 – 16,6%). No mexilhão, berbigão e longueirão é o C18:0 (14,9 – 21,0%) o ácido gordo predominante, sendo, então, seguido pelo C16:0 (13,7 – 18,6%). No que respeita aos MUFA, as proporções variaram entre 8,8 e 33,6%, correspondentes ao berbigão e à lambujinha. Dentro deste grupo de ácidos gordos, dá-se ênfase ao C18:1c9 na lambujinha (9,6%), ostra (5,2%) e longueirão (8,1%). Na ameijoia destaca-se o C20:1n-13 (8,8%), sendo depois seguida pelo C18:1c9 (5,8%). Ainda na lambujinha, além do referido anteriormente, também se destaca o C20:1n-13 (6,6%) e C20:1n-9 (4,1%). Em relação aos PUFA, as proporções encontram-se entre 17,6 e 47,1%, correspondentes à lambujinha e ao mexilhão. Neste grupo de ácidos gordos, a ameijoia, a ostra, o mexilhão e o berbigão apresentam como ácido gordo dominante o DHA (5,2 – 13,6%). Além deste, o mexilhão também tem bem representado o EPA (10,5%). Na ameijoia também se destaca o C22:2 Δ7,13 (6,3%) e o C18:4 (4,4%). Na ostra, além do DHA, também se destaca o C22:2 Δ7,15 (4,3%), seguido pelo C22:2 Δ7,13 (2,9%) e pelo EPA (2,8%), tal como no berbigão, embora neste a ordem seja EPA (3,8%), C22:2 Δ7,15 (3,5%) e C22:2 Δ7,13 (2,5%). No longueirão apenas se destacam o C22:2 Δ7,15 (3,8%) e o C22:2 Δ7,13 (2,7%).

Tabela 9. Teor em ácidos gordos totais (mg/g amostra) e composição em ácidos gordos (% do total de ácidos gordos) dos plasmalogénios de serina (PS_{plsm}).

	Lambujinha	Ameijoia	Ostra	Mexilhão	Berbigão	Longueirão
Total AG	0,18 ± 0,063	0,19 ± 0,074	0,34 ± 0,020	0,48 ± 0,288	0,18 ± 0,112	0,18 ± 0,091
C12:0	0,1 ± 0,09	n.d.	0,2 ± 0,03	0,2*	n.d.	0,1*
C14:0	3,7 ± 5,77	1,8 ± 0,09	1,6 ± 0,74	1,2 ± 1,02	1,1 ± 0,62	2,2 ± 1,08
i-C15:0	0,6 ± 0,86	2,6 ± 0,45	0,6 ± 0,56	0,3 ± 0,14	0,4 ± 0,13	0,6 ± 0,75
a-C15:0	0,4 ± 0,22	1,6*	0,1 ± 0,08	1,1 ± 1,28	0,6 ± 0,02	0,6 ± 0,01
C15:0	1,5 ± 1,62	0,5 ± 0,10	0,9 ± 0,20	0,5 ± 0,30	1,1 ± 0,64	1,2 ± 0,64
i-C16:0	0,5 ± 0,04	1,1*	0,3 ± 0,07	n.d.	1,0 ± 0,06	0,4 ± 0,16
C16:0	15,6 ± 5,74	17,8 ± 3,21	18,5 ± 7,47	13,7 ± 1,13	14,5 ± 6,13	18,6 ± 6,36
i-C17:0	1,1 ± 0,38	2,6 ± 1,90	0,8 ± 0,54	0,9 ± 0,22	2,1 ± 1,01	1,1 ± 0,36
a-C17:0	0,5 ± 0,13	n.d.	0,3 ± 0,16	2,4 ± 1,22	2,1 ± 1,55	1,4 ± 0,93
C17:0	1,9 ± 0,19	2,2 ± 2,14	3,2 ± 1,33	2,5 ± 1,93	2,9 ± 1,57	3,4 ± 0,84
i-C18:0	0,1*	1,1*	0,5 ± 0,26	0,1*	1,2 ± 0,44	0,2*
C18:0	12,4 ± 5,08	13,1 ± 2,25	16,6 ± 2,84	14,9 ± 8,74	21,1 ± 7,93	21,0 ± 7,57
C20:0	0,7 ± 0,11	n.d.	0,2*	0,6 ± 0,66	0,3 ± 0,30	0,4 ± 0,03
C16:1c7	0,1*	0,2*	0,2*	n.d.	0,1 ± 0,07	0,1*
C16:1c9	1,6 ± 0,42	1,0 ± 0,52	0,8 ± 0,35	0,9 ± 0,12	0,4 ± 0,07	0,8 ± 0,40

Tabela 9. (continuação)

	Lambujinha	Ameijoa	Ostra	Mexilhão	Berbigão	Longueirão
C17:1c9	1,0 ± 0,53	0,7*	0,4 ± 0,29	0,2 ± 0,08	1,3 ± 0,93	1,0 ± 0,44
C18:1c9	9,6 ± 11,46	5,8 ± 3,81	5,2 ± 2,60	1,6 ± 1,06	1,1 ± 1,21	8,1 ± 8,36
C18:1c11	3,2 ± 4,07	2,0 ± 1,20	1,7 ± 0,63	1,0 ± 0,89	2,8 ± 2,34	1,6 ± 1,03
C20:1n-13	6,6 ± 11,03	8,8*	2,0 ± 0,96	1,2 ± 1,22	1,0 ± 0,03	1,8 ± 2,10
C20:1n-9	4,1 ± 6,01	n.d.	0,7 ± 0,21	1,6 ± 0,95	1,4 ± 2,09	0,8 ± 0,63
C20:1n-7	0,8 ± 0,67	n.d.	1,4 ± 1,09	3,0 ± 3,25	0,6 ± 0,50	0,9 ± 0,49
C22:1	6,5*	n.d.	0,1 ± 0,06	n.d.	n.d.	n.d.
C16:2 NMI	0,8*	1,8 ± 0,23	0,3 ± 0,14	0,4 ± 0,19	0,9 ± 0,25	0,7 ± 0,31
C16:2n-4	0,2*	n.d.	1,5 ± 1,26	n.d.	0,7*	1,1*
C16:3n-4	0,4*	0,7*	n.d.	0,05*	0,2*	0,6 ± 0,50
C18:2n-6	1,4 ± 1,65	2,7 ± 1,15	2,4 ± 1,71	0,8 ± 0,57	2,0*	1,6 ± 2,13
C18:3n-3	0,7 ± 0,03	n.d.	0,2*	1,8 ± 2,05	n.d.	n.d.
C18:4	2,2 ± 3,35	4,4 ± 2,17	2,8 ± 1,90	1,7 ± 0,66	1,7 ± 1,49	1,1 ± 0,66
C20:2 Δ5,11	n.d.	n.d.	0,2*	3,6 ± 3,90	n.d.	n.d.
C20:2 Δ5,13	n.d.	n.d.	0,3*	1,0 ± 0,30	n.d.	0,6 ± 0,21
C20:3n-9	1,9*	n.d.	n.d.	0,2*	0,5 ± 0,01	0,3 ± 0,02
C20:2n-6	0,3*	2,4*	1,2 ± 0,85	0,5 ± 0,10	1,0 ± 0,40	1,0 ± 0,25
C20:3 Δ5,11,14	0,4 ± 0,29	n.d.	1,4*	0,6 ± 0,24	0,1*	0,2 ± 0,03
C20:3n-6	0,2*	n.d.	1,0*	0,2*	n.d.	1,3 ± 1,36
C20:4n-6	1,2 ± 1,92	2,5*	0,8 ± 0,12	4,0 ± 3,77	1,7*	0,6*
C20:3n-3	0,2*	n.d.	0,1*	0,2*	n.d.	n.d.
C20:4n-3	0,5*	n.d.	0,1*	n.d.	n.d.	n.d.
C20:5n-3	1,1 ± 1,53	1,7 ± 0,13	2,8 ± 0,78	10,5 ± 2,84	3,8*	0,9*
C22:2 Δ7,13	0,6*	6,3 ± 3,09	2,9 ± 0,13	1,5 ± 1,01	2,5 ± 1,0	2,7 ± 1,84
C22:2 Δ7,15	1,4*	1,5 ± 0,784	4,3 ± 4,49	2,7 ± 2,35	3,5 ± 0,70	3,8 ± 2,11
C21:5n-3	n.d.	n.d.	2,2*	0,1*	n.d.	0,4*
C22:3 Δ7,13,16	n.d.	1,2*	1,0*	0,8 ± 0,42	1,1 ± 1,52	0,8 ± 0,89
C22:4n-6	0,5 ± 0,06	n.d.	0,6 ± 0,11	0,4 ± 0,09	n.d.	0,9*
C22:5n-6	1,3*	n.d.	1,0 ± 0,85	1,4 ± 0,69	1,3*	1,0*
C22:5n-3	0,9*	2,1*	1,7 ± 1,54	1,3*	0,9*	0,4*
C22:6n-3	1,4 ± 1,46	7,8 ± 4,74	5,2 ± 1,73	13,6 ± 1,68	9,0*	2,0 ± 0,91
Outros	9,7 ± 0,60	2,1 ± 1,06	9,6 ± 1,01	5,3 ± 1,27	11,9 ± 2,63	11,9 ± 4,46
Σ SFA	39,1 ± 5,02	44,4 ± 5,51	43,8 ± 6,35	38,2 ± 5,12	48,4 ± 6,44	51,2 ± 7,12
Σ MUFA	33,6 ± 3,25	18,5 ± 3,25	12,5 ± 1,58	9,4 ± 0,95	8,8 ± 0,82	15,0 ± 2,49
Σ PUFA	17,6 ± 0,62	35,0 ± 2,17	34,0 ± 1,39	47,1 ± 3,37	30,9 ± 2,01	21,9 ± 0,90
Σ NMI	3,2 ± 0,53	10,7 ± 2,33	10,4 ± 1,55	10,4 ± 1,20	8,1 ± 1,38	8,7 ± 1,46

Resultados apresentados como média ± desvio padrão, em que n=3

*, valor detetado em apenas uma réplica; n.d., não detetado

Total de 7 NMI identificados: C16:2 NMI; C20:2 Δ5,11; C20:2 Δ5,13; C20:3 Δ5,11,14; C22:2 Δ7,13; C22:2 Δ7,15; C22:3 Δ7,13,16 Abreviaturas: SFA- ácidos gordos saturados (inclui ramificados); MUFA – ácidos gordos monoinsaturados; PUFA – ácidos gordos polinsaturados; NMI – ácidos gordos não interrompidos com grupos metileno

Nas tabelas anteriormente apresentadas (Tabelas 7, 8 e 9), encontra-se a soma das percentagens de todos os ácidos gordos NMI identificados nos plasmalogénios: C16:2 NMI; C20:2 Δ 5,11; C20:2 Δ 5,13; C20:3 Δ 5,11,14; C22:2 Δ 7,13; C22:2 Δ 7,15; e o C22:3 Δ 7,13,16.

Ao analisar os resultados obtidos, verifica-se que a subclasse que apresenta maior proporção em ácidos gordos NMI, no global, é o PE_{plsm}, seguido do PS_{plsm}, e por último do PC_{plsm}. E, as amostras que mostraram ter uma maior proporção deste conjunto de ácidos gordos foram o mexilhão e o berbigão. Em alguns casos, a proporção em ácidos gordos NMI é a maior no conjunto dos PUFA, como se verifica na lambujinha (4,8%) e mexilhão (17,3%) no PE_{plsm} e, na ameijoia (10,7%), ostra (10,4%) e longueirão (8,7%) no PS_{plsm}.

4. Composição de dimetilacetais das subclasses de plasmalogénios

A composição em DMA das subclasses de plasmalogénios PC_{plsm}, PE_{plsm} e PS_{plsm} das amostras em estudo encontram-se, respetivamente, nas Tabelas 10, 11 e 12.

Tabela 10. Teor total de dimetilacetais (μ g/g amostra) e composição em dimetilacetais (% do total de dimetilacetais) dos plasmalogénios de colina (PC_{plsm}).

	Lambujinha	Ameijoia	Ostra	Mexilhão	Berbigão	Longueirão
Total DMA	3,39 \pm 0,003	13,40 \pm 0,008	7,75 \pm 0,004	8,35 \pm 0,003	5,40 \pm 0,005	11,02 \pm 0,008
12:0	1,23*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
13:0	8,7 \pm 0,39	n.d.	n.d.	2,0*	n.d.	n.d.
14:0	4,6 \pm 0,32	n.d.	2,9*	3,6 \pm 0,20	n.d.	4,2 \pm 0,53
15:0	28,9*	n.d.	6,0 \pm 0,02	6,4 \pm 0,11	1,9 \pm 0,02	5,7 \pm 0,43
i-16:0	n.d.	6,6*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
16:0	7,8 \pm 0,47	10,9 \pm 0,15	13,3 \pm 0,29	17,2 \pm 0,83	12,2 \pm 1,09	13,3 \pm 1,25
i-17:0	7,8*	9,8 \pm 0,74	10,6 \pm 0,44	2,2*	13,5*	1,5*
a-17:0	31,4*	28,2 \pm 2,14	n.d.	n.d.	n.d.	15,9*
17:0	n.d.	n.d.	5,5*	4,8*	n.d.	1,8*
18:0 ramificados	n.d.	3,1*	n.d.	n.d.	n.d.	11,9*
i-18:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8,0*	2,7*
a-18:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10,5*	2,8*
18:0	9,5 \pm 0,82	38,5 \pm 2,12	22,3 \pm 1,47	24,3 \pm 2,36	38,9 \pm 7,12	15,4 \pm 2,70
19:0	n.d.	n.d.	25,3 \pm 0,59	34,5 \pm 2,35	12,2 \pm 1,02	10,0 \pm 0,41
18:1	n.d.	n.d.	11,6 \pm 0,58	n.d.	2,8 \pm 0,21	3,8*
20:1	n.d.	2,8*	2,5*	5,0*	n.d.	11,0 \pm 2,26

Resultados apresentados como média \pm desvio padrão, em que n=3

*, valor detetado em apenas uma réplica; n.d., não detetado

No que diz respeito ao PC_{plsm} (Tabela 10), o DMA mais frequente e que, globalmente, apresenta uma percentagem superior relativamente aos restantes é o 18:0, seguido pelo 19:0 e pelo a-17:0 e, por último pelo 16:0. Analisando cada amostra individualmente, na lambujinha, o DMA que apresenta maior percentagem, em relação ao teor total de DMA, é o a-17:0 (31,4%), sendo depois seguido pelo 15:0 (28,9%). Na ameijoia e berbigão, o 18:0 é aquele que maior quantidade apresenta (38,5 e 38,9%), sendo depois, no caso da ameijoia, seguido pelo a-17:0 (28,2%), e, pelo i-17:0, no berbigão (13,5%). Tal como na lambujinha, também o longueirão é rico em a-17:0 (15,9%), sendo depois seguido, de perto, pelo 18:0 (15,4%) e pelo 16:0 (13,3%). Também apresenta elevada percentagem nos 18:0 ramificados (11,9%) e no 20:1 (11,0%). Tanto o mexilhão como a ostra apresentam maiores percentagens de 19:0 (34,5 e 25,3%), sendo logo seguidos pelo 18:0 (24,3 e 22,3%) e depois pelo 16:0 (17,2 e 13,3%).

Tabela 11. Teor total de dimetilacetais (µg/g amostra) e composição em dimetilacetais (% do total de dimetilacetais) dos plasmalogénios de etanolamina (PE_{plsm}).

	Lambujinha	Ameijoia	Ostra	Mexilhão	Berbigão	Longueirão
Total DMA	6,71 ± 0,004	35,34 ± 0,027	41,82 ± 0,043	106,66 ± 0,108	31,84 ± 0,038	32,44 ± 0,019
12:0	4,2*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
13:0	20,2 ± 0,88	3,0*	n.d.	0,9*	n.d.	1,6*
14:0	3,1 ± 0,02	n.d.	0,7*	0,7 ± 0,01	n.d.	1,0 ± 0,15
15:0	9,2*	n.d.	4,9 ± 0,94	4,1 ± 0,48	2,0 ± 0,09	2,7 ± 0,16
i-16:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
16:0	6,2*	3,9*	3,8 ± 0,39	6,3 ± 0,67	7,6 ± 0,78	10,0 ± 0,68
i-17:0	n.d.	7,2 ± 0,40	9,9 ± 1,09	2,1*	12,6 ± 0,24	4,0*
a-17:0	25,9*	9,3 ± 0,52	4,9*	n.d.	n.d.	6,8 ± 1,38
17:0	10,8*	7,8 ± 0,57	n.d.	0,5*	3,2 ± 0,28	2,0 ± 0,14
18:0 ramificados	n.d.	7,3 ± 0,14	n.d.	11,8*	n.d.	n.d.
i-18:0	4,4*	n.d.	1,6*	n.d.	7,5*	1,8 ± 0,02
a-18:0	n.d.	n.d.	3,6*	n.d.	9,7*	1,1*
18:0	5,8 ± 0,36	21,2 ± 1,91	54,1 ± 1,34	57,8 ± 8,95	39,5 ± 3,63	39,1 ± 2,99
19:0	n.d.	n.d.	5,1 ± 0,25	4,4 ± 0,66	3,1 ± 0,09	4,7 ± 0,13
18:1	3,9 ± 0,05	39,7*	3,3 ± 0,57	0,8 ± 0,04	10,2 ± 0,10	6,6 ± 0,40
20:1	6,5 ± 0,20	0,5*	8,2 ± 0,76	10,5 ± 0,48	4,5*	18,7 ± 1,09

Resultados apresentados como média ± desvio padrão, em que n=3

*, valor detetado em apenas uma réplica; n.d., não detetado

Relativamente ao PE_{plsm} (Tabela 11), o DMA mais frequente e que, globalmente, apresenta uma percentagem superior relativamente aos restantes, é o 18:0, seguido, de longe, pelo 18:1 e pelo 20:1. Analisando cada amostra individualmente, na lambujinha, tal como na subclasse anterior, o DMA mais frequente é o a-17:0 (25,9%), sendo depois seguido pelo 13:0 (20,2%). Nas restantes amostras, com exceção da ameijoia, é o 18:0 que se destaca – ostra, 54,1%; mexilhão, 57,8%; berbigão, 39,5%; longueirão, 39,1%. No caso da ameijoia, o DMA dominante é o 18:1 (39,7%), seguido, então, pelo 18:0 (21,2%). No longueirão, também se deve dar destaque ao 20:1, que apresenta uma percentagem relativamente elevada (18,7%), comparativamente com os restantes DMA.

Tabela 12. Teor total de dimetilacetais (µg/g amostra) e composição em dimetilacetais (% do total de dimetilacetais) dos plasmalogénios de serina (PS_{plsm}).

	Lambujinha	Ameijoia	Ostra	Mexilhão	Berbigão	Longueirão
Total DMA	7,20 ± 0,003	25,54 ± 0,015	56,24 ± 0,065	84,53 ± 0,060	29,27 ± 0,033	30,43 ± 0,022
12:0	4,2*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
13:0	10,3 ± 0,35	8,0*	1,0*	0,7*	n.d.	n.d.
14:0	4,4 ± 0,02	n.d.	0,9 ± 0,10	0,3*	n.d.	2,8 ± 0,11
15:0	12,7*	n.d.	1,5 ± 0,23	3,5 ± 0,57	1,6 ± 0,14	2,4 ± 0,13
i-16:0	n.d.	3,2 ± 0,37	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
16:0	7,6 ± 0,04	15,3 ± 1,15	6,6 ± 0,25	9,4 ± 0,97	13,9 ± 1,47	14,9 ± 0,52
i-17:0	1,3*	8,6 ± 0,28	4,3 ± 0,64	0,6*	6,0 ± 1,43	2,4 ± 0,11
a-17:0	26,5*	12,2 ± 0,59	1,5*	n.d.	n.d.	4,0 ± 1,06
17:0	n.d.	6,0*	2,6 ± 0,38	0,3*	0,5*	0,8*
18:0 ramificados	n.d.	5,2 ± 0,46	n.d.	5,3*	n.d.	n.d.
i-18:0	3,7*	n.d.	1,1*	n.d.	10,6*	2,6 ± 0,10
a-18:0	n.d.	n.d.	3,8*	n.d.	12,8*	0,8 ± 0,03
18:0	10,3 ± 0,31	41,5 ± 0,03	62,3 ± 3,55	68,1 ± 5,65	42,3 ± 2,78	37,8 ± 4,17
19:0	2,2*	n.d.	2,0*	3,8 ± 0,14	2,4 ± 0,30	4,0 ± 0,13
18:1	11,2 ± 0,36	n.d.	2,4 ± 0,35	1,0*	8,8 ± 0,51	6,3 ± 0,69
20:1	5,6 ± 0,10	n.d.	10,0*	7,0 ± 0,59	1,0*	21,1 ± 0,94

Resultados apresentados como média ± desvio padrão, em que n=3

*, valor detetado em apenas uma réplica; n.d., não detetado

Em relação ao PS_{plsm} (Tabela 12), o DMA mais frequente e que, globalmente, apresenta uma percentagem superior relativamente aos restantes, tal como anteriormente, é o 18:0, seguido, também, de longe, pelo 16:0 e pelo 20:1. Analisando cada amostra individualmente, na lambujinha, tal como já se verificou nas subclasses anteriores, o DMA mais frequente é o a-17:0 (26,5%), sendo depois seguido pelo 15:0 (12,7%) e pelo 18:1 (11,2%). Nas restantes amostras, é o 18:0 que se destaca – ameijoia, 41,5%; ostra, 62,3%; mexilhão, 68,1%; berbigão,

42,3%; longueirão, 37,8%. Na ameijoia, destaca-se ainda o 16:0 (15,3%) e o a-17:0 (12,2%). Na ostra, também se destaca o 20:1 (10,0%), tal como no longueirão (21,1%). Neste, ainda se destaca o 16:0 (14,9%). Já no que diz respeito ao berbigão, além do 18:0, também com percentagens relativamente elevadas, encontra-se o 16:0 (13,9%) e o a-18:0 e i-18:0 (12,8 e 10,6% respetivamente).

5. Fatores de conversão de ácidos gordos e dimetilacetais

Foram determinados os fatores de conversão para cada classe/subclasse lipídica de cada amostra em estudo, e determinou-se os seus valores médios. Assim, na Tabela 13 são apresentados os fatores de conversão médios para o conjunto de bivalves estudados. Na Tabela 14, encontra-se um exemplo de como foram determinados estes fatores de conversão.

Tabela 13. Fatores de conversão (FC) médios de ácidos gordos (AG) e/ou dimetilacetais (DMA) nas classes lipídicas dos bivalves estudados.

	FC g AG+DMA/g lípidos	FC g AG/g lípidos	FC g DMA/ g lípidos
Lípidos totais	0,82 ± 0,003	0,61 ± 0,005	0,21 ± 0,005
<i>Lípidos neutros</i>			
Ésteres de colesterol	0,44 ± 0,005	0,44 ± 0,005	
Triacilgliceróis	0,96 ± 0,001	0,96 ± 0,001	
<i>Fosfolípidos</i>			
Fosfatidilcolina	0,71 ± 0,003	0,71 ± 0,003	
Plasmenilcolina	0,70 ± 0,005	0,36 ± 0,005	0,34 ± 0,010
Fosfatidiletanolamina	0,76 ± 0,004	0,76 ± 0,004	
Plasmeniletanolamina	0,75 ± 0,006	0,40 ± 0,006	0,35 ± 0,010
Fosfatidilserina	0,72 ± 0,004	0,72 ± 0,004	
Plasmenilserina	0,70 ± 0,004	0,37 ± 0,004	0,34 ± 0,006
Fosfatidilinositol	0,65 ± 0,002	0,65 ± 0,002	
Total plasmalogénios	0,72 ± 0,005	0,38 ± 0,004	0,34 ± 0,008

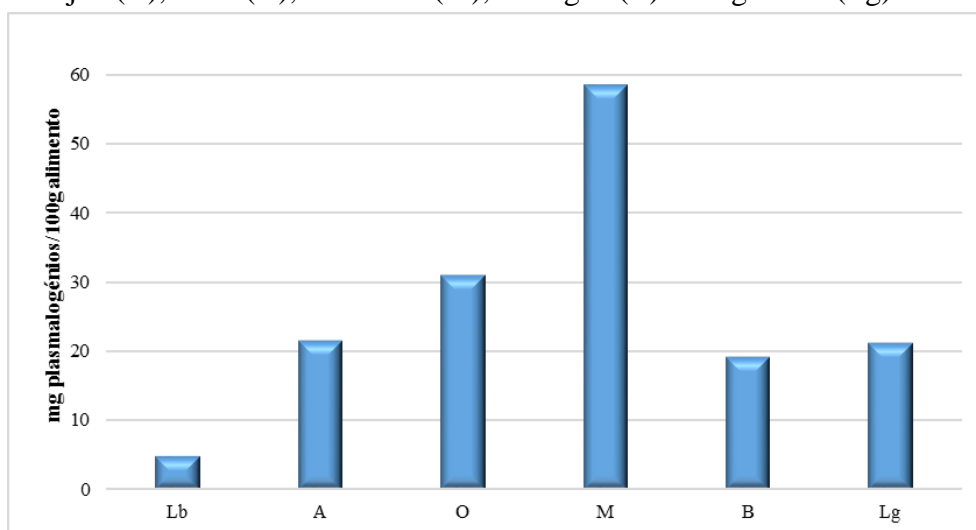
Tabela 14. Determinação dos fatores de conversão – exemplo: mexilhão (M2)

Classe lipídica	g lípidos/ 100g LT	Peso molecular médio	Peso molecular médio/AG	Peso molecular médio/DMA	Nº AG	Nº DMA	Contribuição AG para o peso molecular médio	Contribuição DMA para o peso molecular médio	FC _t (g AG+DMA /g lípidos)	FC _{AG} (g AG/g lípidos)	FC _{DMA} (g DMA/ g lípidos)
<i>Lípidos neutros</i>											
Ésteres de colesterol	10,8	649,13	279,13		1	0	279,13		0,43	0,43	
Triacilgliceróis	69,2	884,06	281,02		3	0	843,06		0,95	0,95	
Ácidos gordos livres	7,9	276,89	276,89		1	0	276,89		1	1	
<i>Fosfolípidos</i>											
Fosfatidilcolina	1,6	760,37	267,68		2	0	535,37		0,70	0,70	
Plasmenilcolina	0,6	753,84	274,61	254,23	1	1	274,61	254,23	0,70	0,36	0,34
Fosfatidiletanolamina	5,5	749,94	283,97		2	0	567,94		0,76	0,76	
Plasmeniletanolamina	0,5	732,39	285,46	264,93	1	1	285,46	264,93	0,75	0,39	0,36
Fosfatidilserina	2,5	784,60	279,3		2	0	558,6		0,71	0,71	
Plasmenilserina	0,8	761,13	274,36	260,77	1	1	274,36	260,77	0,70	0,36	0,34
Fosfatidilinositol	0,6	863,29	281,15		2	0	562,29		0,65	0,65	

Abreviaturas: LT – lípidos totais; AG – ácido gordo; DMA – dimetilacetal; FC – fator de conversão

Ao aplicar os fatores de conversão determinados, e sabendo qual o teor em DMA de cada amostra, conseguimos determinar a quantidade de plasmalogénios existente em cada 100g de amostra. Estes resultados encontram-se no Gráfico 6. Pela análise do mesmo, verifica-se que o mexilhão é o bivalve, dentro dos estudados, aquele que apresenta maior teor em plasmalogénios (58,6 mg/100g), sendo seguido pela ostra (31,1 mg/100g). A lambujinha foi o que apresentou menor teor em plasmalogénios (5 mg/100g).

Gráfico 6. Conteúdo total de plasmalogénios (mg/100g alimento) nos bivalves: lambujinha (Lb), ameijoia (A), ostra (O), mexilhão (M), berbigão (B) e longueirão (Lg).



Capítulo 4: Discussão dos resultados

1. Composição lipídica dos bivalves e caracterização de fosfolípidos

Os bivalves são seres marinhos ricos em plasmalogénios, uma subclasse lipídica dos fosfolípidos, caracterizada por, na posição sn-1 do glicerol, a cadeia carbonada estar ligada através de uma ligação éter vinílica, a qual está associada a benefícios na saúde humana e à longevidade dos seres vivos, dado o seu papel protetor (Kraffe et al., 2004). Além disto, também se sabe que, nos plasmalogénios, na posição sn-2 do glicerol, encontram-se, maioritariamente, ácidos gordos como o DHA, EPA ou NMI (Kraffe et al., 2004). No entanto, a sua composição lipídica é variável com a espécie bivalve em estudo e/ou mesmo dentro da mesma espécie, de acordo com a época do ano (Bergé & Barnathan, 2005; Nollet & Toldrá, 2010). Contudo, a caracterização de ácidos gordos dos bivalves carece em informação disponível e, daquela existente, a maioria caracteriza bivalves de zonas específicas. E, no que se refere aos bivalves da costa portuguesa, desconhece-se a existência de algum estudo em que se tenha realizado a caracterização e composição em ácidos gordos dos fosfolípidos, incluindo os plasmalogénios.

Comparando a composição média de lípidos totais por cada 100g de alimento, obtido nos bivalves estudados, com a composição lipídica dos bivalves presentes na Tabela de Composição dos Alimentos (INSA, 2007), nomeadamente a ameijoia, o berbigão, o mexilhão e a ostra, verificou-se que os valores encontrados são superiores àqueles referenciados pela referida tabela.

No que diz respeito à composição média das diferentes classes lipídicas dos bivalves estudados, estes mostraram ser compostos por lípidos neutros, ou seja, triacilgliceróis, ésteres de colesterol e ácidos gordos livres, e fosfolípidos, sendo que na maioria dos bivalves estudados, os lípidos neutros estão em maior quantidade, tal como se verificou no estudo realizado por Hanuš et al. (2009). Contudo, num estudo realizado por Miller, Pearce e Bettjeman (2014), que envolveu apenas uma espécie bivalve, esta apresentou um maior conteúdo em fosfolípidos do que em lípidos neutros.

Os fosfolípidos, grupo de lípidos anfipáticos, dividem-se, de acordo com o grupo fosfato, em PC, PE, PS e PI. Cada uma destas classes, pode-se ainda dividir em subclasses lipídicas, de acordo com o tipo de ligação na posição sn-1 entre o glicerol e a cadeia carbonada. Se a ligação for uma ligação éster estamos perante diacil-glicerofosfolípidos. No entanto, se for uma ligação éter já estamos perante um alquil-glicerofosfolípido ou um alquenil-glicerofosfolípido, também denominado de plasmalogénio, no caso de ser uma ligação éter vinílica (Brites et al., 2004; Braverman & Moser, 2012). Posto isto, nos bivalves em estudo, as classes lipídicas PC, PE, PS e PI, encontram-se em todas as amostras analisadas, sendo a classe maioritária o PE, seguido

do PS e do PC, e em menor extensão o PI. No estudo realizado por Hanuš et al. (2009), este também verificou que as classes PE e PI eram, respetivamente, a principal e a menos importante neste grupo de lípidos. Num estudo mais antigo (Koizumi, Jeong & Ohshima, 1990), que envolveu apenas a ostra (*Crassostera gigas*), e que analisou as classes PE e PC, verificou que o PC era o mais frequente, ao contrário do verificado nos bivalves aqui analisados.

Segundo os estudos realizados por Kraffe et al. (2004) e por Hanuš et al. (2009), os plasmalogénios são a subclasse dos fosfolípidos que se encontra em maioria nos bivalves estudados por cada um deles, nomeadamente no PE e PS. O PC é mais rico em diacil-glicerofosfolípidos. Contudo, nos bivalves da costa portuguesa aqui analisados, são todos, independentemente da classe lipídica, ricos em diacil-glicerofosfolípidos em detrimento dos plasmalogénios, ao contrário do verificado pelos autores referenciados anteriormente. De um modo geral, neste estudo, dentro dos plasmalogénios, a subclasse mais frequente foi o PS_{plsm}. Sendo que, a subclasse de plasmalogénios referida pelos autores anteriormente mencionados como a mais frequente, o PE_{plsm}, foi aquela que menor conteúdo apresentou neste estudo.

Relativamente à composição em ácidos gordos dos plasmalogénios, segundo Kraffe et al. (2004), no PE_{plsm}, os ácidos gordos mais frequentes são os PUFA, tal como se verificou na maioria dos bivalves aqui estudados. Contudo, no mesmo estudo, os ácidos gordos que se encontram em menor quantidade nesta subclasse são os SFA, ao contrário do demonstrado aqui, em que são os MUFA os ácidos gordos menos frequentes. O único bivalve que corrobora o mencionado anteriormente é a lambujinha, cujos SFA são os ácidos gordos que se encontram em maior quantidade relativamente aos restantes. No que ao PC_{plsm} diz respeito, Kraffe et al. (2004) demonstra que, uma vez mais, os PUFA são os ácidos gordos maioritários, sendo seguido pelos SFA e, por último pelos MUFA. Contudo, nos bivalves estudados, os SFA são os mais frequentes, mas os MUFA são os minoritários, indo, neste ponto, de encontro ao referido pelo autor mencionado. No PS_{plsm}, segundo o estudo de Kraffe et al. (2004), os bivalves são ricos em PUFA, ao contrário do verificado neste estudo, em que os bivalves são, na sua maioria, ricos em SFA.

Quando se trata da caracterização em ácidos gordos dos plasmalogénios, esta varia de acordo com o bivalve em questão, no entanto existem pontos essenciais que poderão ser comuns a todos eles. Do grupo dos SFA, segundo os dados de Kraffe et al. (2004), o C16:0 e C18:0 são os ácidos gordos mais frequentes. Nos bivalves aqui estudados, tal como o autor referenciado mostrou, de acordo com a amostra e com a subclasse envolvida, a frequência em SFA é variável. Contudo, o C16:0 e o C18:0 também são os ácidos gordos mais frequentes em todas as amostras e em todas as subclasses lipídicas.

Já no conjunto dos MUFA, Kraffe et al. (2004) mostra no seu estudo que, no PE_{plsm} e PS_{plsm}, o C20:1n-11 é o ácido gordo mais frequente, em todas as suas amostras, e no PC_{plsm}, de acordo com a amostra, são o C18:1n-7 (ostra), C20:1n-9 (mexilhão) e C18:1n-9 (ameijoia). Nos bivalves aqui estudados não foi isto que se verificou. No PC_{plsm}, na maioria das amostras analisadas, o ácido gordo mais frequente foi o C18:1n-9. Tal como no PE_{plsm} e no PS_{plsm}, embora com algumas variações em determinadas amostras. No que toca aos PUFA, sabe-se que estes, nos bivalves, na maioria dos casos, são ricos em DHA, EPA e ácidos gordos NMI (Koizumi et al., 1990; Murphy, Mooney, Mann, Nichols & Sinclair, 2002; Kraffe et al., 2004; Hanuš et al., 2009), tal como se verificou na maioria dos bivalves estudados, principalmente nas subclasses PE_{plsm} e PS_{plsm}. A exceção foi a lambujinha, em que em nenhuma destas subclasses lipídicas mostrou conter um teor relevante destes ácidos gordos.

Os ácidos gordos NMI são frequentemente encontrados na composição lipídica de muitos animais marinhos invertebrados, como os bivalves. Porém o seu papel fisiológico não é totalmente compreendido (Kawashima & Ohnishi, 2004). Sabe-se, apenas, que estes competem com os PUFA na sua incorporação nos lípidos e que, nas membranas celulares, são resistentes ao processo oxidativo (Barnathan, 2009). Nos bivalves estudados foram identificados os seguintes ácidos gordos NMI: C16:2 NMI; C20:2 Δ5,11; C20:2 Δ5,13; C20:3 Δ5,11,14; C22:2 Δ7,13; C22:2 Δ7,15 e C22:3 Δ7,13,16. Deste grupo de ácidos gordos NMI, também Kraffe et al. (2004) identificou-os, com exceção do C16:2 NMI e o C20:3 Δ5,11,14. Hanuš et al. (2009) apenas identificou 4: C20:2 Δ5,11; C20:2 Δ5,13; C22:2 Δ7,13 e C22:2 Δ7,15. Ainda Kraffe et al. (2004), verificou que no somatório dos ácidos gordos NMI identificados, os plasmalogénios que maior percentagem apresentaram nestes foram os referentes ao PS_{plsm}, seguido pelo PE_{plsm}. Contrariamente ao que se verificou neste estudo, em que foi o PE_{plsm} aquele que apresentou maior percentagem em NMI. No entanto, tal como os autores referenciados, os ácidos gordos NMI mais frequentes em todas as amostras e subclasses lipídicas analisadas neste estudo foram o C22:2 Δ7,13 e C22:2 Δ7,15. Dada a frequência destes ácidos gordos nos bivalves, seria necessário a realização de mais estudos que envolvessem ácidos gordos NMI, de modo a verificar o seu efeito na saúde humana, ou se estes são apenas ácidos gordos com função estrutural.

No que diz respeito à cadeia carbonada na posição sn-1 do glicerol nos plasmalogénios, Hanuš et al. (2009) refere que, em todas as subclasses lipídicas, o DMA predominante é o 18:0, seguido pelo 18:1, no caso do PE_{plsm} e PS_{plsm}, e, pelo 16:0 no PC_{plsm}. Tal como o autor referenciado, nos bivalves aqui analisados, de um modo global, também o DMA 18:0 é a cadeia carbonada dominante em todos os plasmalogénios. Também Berdyshev (1989), num estudo realizado por

este, identificou o DMA 18:0 como sendo o mais frequente, mas também mencionou a presença de DMA como o 20:1, 16:0, 18:1 e do conjunto de 17:0, como possíveis DMA com frequência elevada em alguns bivalves. Um dos bivalves estudados em que verifica que o DMA 18:0 não é o dominante, é na lambujinha, em que o DMA dominante é o a-17:0.

A presença de DMA com estrutura iso e anteiso não é comum nos alimentos (como a carne e o leite de ruminantes), ao contrário dos ácidos gordos, também de cadeia iso e anteiso, que são frequentemente detetados nos alimentos provenientes de ruminantes (Rosa et al, 2014; Quaresma, Rodrigues, Alves & Bessa, 2016; Rego et al., 2016). Contudo, DMA de estrutura iso e anteiso existem em grande abundância nos conteúdos digestivos dos ruminantes (Alves et al., 2013), uma vez que eles são parte integrante das membranas da população microbiana anaeróbia que existe neste compartimento. Deste modo, sugere-se que a presença destes DMA nos bivalves seja também de origem microbiana. No estudo realizado por Hanuš et al. (2009), este também verificou a presença de DMA ramificados, nomeadamente no PE_{plsm} e PS_{plsm}. Contudo no PE_{plsm} estes não foram identificados e, no PS_{plsm} identificaram ramificações no DMA 16:0, 18:0 e 20:0. No entanto a sua posição não foi confirmada. Neste estudo, tal como o autor referenciado, também foram identificados DMA ramificados de cadeia 16:0 e 18:0, em todas as classes de plasmalogénios.

Ao longo dos anos, vários têm sido os estudos que demostram os benefícios da ingestão de PUFA, como o EPA e DHA, na saúde humana. Exemplos desses benefícios são os benefícios no sistema cardiovascular, e a sua ação como anti-inflamatório, bem como a prevenção da Doença de Alzheimer. Além disto, também se sabe que a principal fonte alimentar que nos fornece estes ácidos gordos são os animais de origem marinha (Mozaffarian & Wu, 2012). A ingestão recomendada de EPA+DHA, para que os benefícios associados a estes ácidos gordos sejam eficazes, de acordo com a FAO (2010), para adultos, é de 0,250 – 2g por dia. Assim, sabendo que a composição em ácidos gordos é variável entre os bivalves estudados e, tendo como referência a ingestão recomendada mínima de EPA+DHA, verificou-se que, com exceção da lambujinha, os bivalves estudados são uma boa fonte alimentar do conjunto de ácidos gordos EPA+DHA. Assim sendo, um consumo aproximado entre 235g a 345g por dia destes bivalves (a quantidade depende do bivalve ingerido) suprimirá as necessidades mínimas diárias. No caso da lambujinha, para atingir as necessidades mínimas, teria de se ingerir uma quantidade muito superior, quantidade esta que não é praticável.

Além dos benefícios dos PUFA associados à saúde humana, estes ácidos gordos estão negativamente associados à longevidade dos seres vivos, como os bivalves. Sabe-se que, quanto

maior a suscetibilidade dos lípidos das membranas à peroxidação maior o stress oxidativo e menor a longevidade do animal. E, esta suscetibilidade é tanto maior quanto maior o teor de PUFA nas membranas celulares. Ou seja, quanto maior o teor de PUFA nas membranas celulares menor a longevidade do animal. Contudo, existem alguns constituintes lipídicos que reduzem esta suscetibilidade à peroxidação, como os plasmalogénios e os ácidos gordos NMI (Munro & Blier, 2012). No caso dos plasmalogénios, a ligação éter vinílica atua como sequestrador de radicais livres de oxigénio e evita a auto-oxidação, conferindo assim proteção antioxidante às membranas. Também os ácidos gordos NMI, devido à sua invulgar posição das duplas ligações ao longo da cadeia carbonada, conferem às membranas celulares uma melhor resistência aos processos oxidativos comparativamente com os outros PUFA (Barnathan, 2009). Assim, a presença dos plasmalogénios e ácidos gordos NMI nos bivalves poderão conferir maior proteção às membranas celulares ricas em DHA e outros PUFA e, desta forma, estarem associadas à longevidade dos bivalves. De facto, a sua longevidade é conhecida, podendo em algumas espécies alcançar os 500 anos, como referenciado na maior base de dados sobre a longevidade das espécies animais (AnAge: The Animal Ageing and Longevity Database). Curiosamente, não foi encontrado nesta base de dados nenhuma das espécies estudadas neste trabalho. Também não é possível, com este trabalho, associar a presença e concentração de plasmalogénios e ácidos gordos NMI à longevidade dos bivalves da costa portuguesa, pelo que serão necessários mais estudos neste âmbito.

Concluindo, verificou-se alguma variação na composição lipídica entre os bivalves analisados, sendo a lambujinha, aquela que mais diferenças, relativamente aos restantes bivalves, apresentou. Além destas diferenças inter-espécies, também se verificou alguma variância entre os valores médios dentro de cada espécie. Além disto, houve muitos aspetos em que se distanciou dos estudos existentes sobre esta temática, embora alguns não envolvessem as mesmas espécies de bivalves utilizadas neste estudo. Parte desta divergência encontrada poderá dever-se ao facto de as espécies bivalves analisadas serem, na sua maioria, de habitats diferentes, em que as condições ambientais, como a temperatura ou a disponibilidade de alimento não são as mesmas, tal como é referido por Bergé & Barnathan, (2005) e por Nollet & Toldrá (2010). Outro ponto que também pode estar relacionado com estas diferenças composicionais foi o facto de os bivalves terem sido adquiridos em épocas do ano distintas e, por isso, poderem estar em ciclo reprodutivos e de maturação diferentes, que, de acordo com Linehan, Connor e Burnell (1999), Ojea et al. (2004) e, também Aníbal, Esteves e Rocha (2011), pode afetar a composição lipídica dos bivalves.

2. Fatores de conversão lipídicos

As tabelas de composição de alimentos fornecem os seus dados, na maioria dos casos, em 100g de alimento, para que o consumidor consiga saber os nutrientes ingeridos com um determinado alimento nas porções escolhidas por este. Contudo, como acontece com os lípidos, os seus dados são normalmente expressos em percentagem do peso de lípidos totais e/ou da classe lipídica em estudo. Por outro lado, a determinação simultânea do teor em lípidos e do teor em ácidos gordos não está muitas vezes acessível. Por isso, é importante que se determinem fatores de conversão que relacionem o conteúdo de ácidos gordos com um dado alimento, ou com o teor de lípidos totais presente nesse alimento (Weirauch et al., 1977).

O trabalho mais importante nesta área foi realizado por Weirauch et al. (1977). Contudo, no que se refere aos bivalves, o fator de conversão lipídico determinado por este é muito genérico e variável. Além disto, não são, também, conhecidos, nem para bivalves nem para outro alimento, fatores de conversão lipídicos para os dimetilacetais, provenientes dos plasmalogénios. Por este motivo, procedeu-se ao cálculo de fatores de conversão lipídicos de ácidos gordos e dimetilacetais, para os bivalves em estudo, para cada classe e subclasse lipídica analisada. Estes fatores permitem quantificar de forma rápida o teor em cada classe lipídica, nomeadamente de plasmalogénios, por porção de alimento. Esta determinação não é conhecida e é de relevante importância, pois existem alguns estudos que indicam que a ingestão de plasmalogénios poderá ajudar na prevenção e/ou melhoria de algumas situações patológicas. Contudo, não foi encontrado nenhum valor específico do que se deverá ingerir de modo a garantir que a sua incorporação nas membranas celulares ajude no combate aos efeitos negativos de algumas patologias, como o Alzheimer. E, por isso, coloca-se a questão: será que os resultados observados neste estudo, relativamente ao teor de plasmalogénios presente em cada 100g de bivalve estudado, serão suficientes para garantir a sua incorporação nas membranas celulares? Por este motivo verifica-se que ainda há trabalho a fazer e, estes dados, relativamente aos fatores de conversão lipídicos para os plasmalogénios, poderão contribuir para futuros avanços nesta área.

Conclusão e Perspetivas futuras

Ao longo dos anos, alguns estudos sobre plasmalogénios em bivalves foram divulgados. Contudo, poucos são aqueles que fazem uma caracterização completa da composição em ácidos gordos, quer a nível dos plasmalogénios, quer a nível global. Dos estudos realizados, que envolviam plasmalogénios em bivalves, todos mencionavam a sua riqueza em plasmalogénios. Contudo, nos bivalves da costa portuguesa que foram analisados tal não se verificou. Apesar destes estarem presentes, verificou-se a predominância dos diacil-glicerofosfolípidos, na fração dos lípidos polares, em todas as amostras. Esta ocorrência poderá dever-se à localização dos bivalves, bem como a fatores internos dos próprios bivalves, como o seu estado de maturação. Para verificar se é assim mesmo, mais estudos devem ser realizados neste âmbito, nomeadamente a nível da composição lipídica dos bivalves de acordo com o seu estado de desenvolvimento e maturação sexual. Também seria importante que se realizassem mais estudos de caracterização lipídica e de ácidos gordos nos fosfolípidos utilizando outras técnicas de separação de classes e subclasses lipídicas, de modo a verificar a eficiência das várias técnicas existentes.

No que aos fatores de conversão diz respeito, estes são importantes para converter os ácidos gordos presentes numa amostra num dígito de leitura mais acessível ao consumir, ou seja, a quantidade de um determinado nutriente, por exemplo os plasmalogénios, presente em cada 100g de um alimento. Assim, neste trabalho determinou-se pela primeira vez fatores de conversão de ácidos gordos e dimetilacetais nas diversas classes lipídicas dos bivalves, nomeadamente nas diferentes subclasses de plasmalogénios. Estes dados permitirão futuramente determinar a composição em plasmalogénios de uma forma mais rápida e acessível, apenas através da determinação do teor de dimetilacetais. Desta forma, poderá ser possível estimar mais facilmente a ingestão de plasmalogénios pela população a partir dos dados de ingestão de bivalves e do teor em ácidos gordos e dimetilacetais.

Para terminar, este trabalho contribuiu com nova informação sobre a composição lipídica e composição de ácidos gordos das 6 espécies de bivalves da costa portuguesa estudadas, que poderá ser utilizada para atualização das tabelas de composição dos alimentos.

Referências bibliográficas

- Ackman, R. G. (1983). Fatty acid metabolism of bivalves. *Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition*, 358–376.
- Alves, S. P., Santos-Silva, J., Cabrita, A. R. J., Fonseca, A. J. M., & Bessa, R. J. B. (2013). Detailed Dimethylacetal and Fatty Acid Composition of Rumen Content from Lambs Fed Lucerne or Concentrate Supplemented with Soybean Oil. *PLoS ONE*, 8(3), 1–14.
- Anacleto, P., Barrento, S., Nunes, M. L., Rosa, R. & Marques, A. (2014). Portuguese consumers' attitudes and perceptions of bivalve molluscs. *Food Control*, 41, 168–177.
- AnAge: *The Animal Ageing and Longevity Database*. Acedido em Out. 17, 2016, disponível em: <http://genomics.senescence.info/species/>
- Aníbal, J., Esteves, E., & Rocha, C. (2011). Seasonal Variations in Gross Biochemical Composition, Percent Edibility, and Condition Index of the Clam *Ruditapes decussatus* Cultivated in the Ria Formosa (South Portugal). *Journal of Shellfish Research*, 30(1), 17–23.
- Barnathan, G. (2009). Non-methylene-interrupted fatty acids from marine invertebrates: Occurrence, characterization and biological properties. *Biochimie*, 91(6), 671–678.
- Braverman, N. E. & Moser, A. B. (2012). Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1822(9), 1442–1452.
- Berdyshev, E. V. (1989). Fatty aldehydes of the phosphatidylethanolamines of marine invertebrates. *Chemistry of Natural Compounds*, 25(5), 525–529.
- Bergé, J. P. & Barnathan, G. (2005). Fatty acids from lipids of marine organisms: Molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 96(1), 49–125.
- Bligh, E.G. & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911–917.
- Brites, P., Ferreira, A. S., Silva, T. F., Sousa, V. F., Malheiro, A. R., Duran, M., Waterham, H.R., Baes, M. & Wanders, R. J. A. (2011). Alkyl-glycerol rescues plasmalogen levels and pathology of ether-phospholipid deficient mice. *PloS One*, 6(12), 1–11.
- Brites, P., Waterham, H. R. & Wanders, R. J. A. (2004). Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1636(2-3), 219–231.
- Burdge, G. C., Wright, P., Jones, A. E. & Wootton, S. A. (2000). A method for separation of phosphatidylcholine, triacylglycerol, non-esterified fatty acids and cholesterol esters from plasma by solid-phase extraction. *The British Journal of Nutrition*, 84, 781–787.
- Christie, W. W. (2014). *Ether Lipids - structure, composition, biochemistry and analysis*. Acedido em Nov 11, 2015, disponível em: <http://lipidlibrary.aocs.org/Primer/content.cfm?ItemNumber=39320>

- Christie, W. W. & Han, X. (2012). *Lipid analysis. Isolation, separation, identification and lipidomic analysis* (4th ed.). Cambridge: Woodhead Publishing.
- Compilers' Toolbox™ (2016). *Fatty acids in food*. Acedido em Mar. 18, 2016, disponível em: http://toolbox.foodcomp.info/ToolBox_FattyAcids.asp
- Das, A. K., Holmes, R. D., Wilson, G. N. & Hajra, A. K. (1992). Dietary ether lipid incorporation into tissue plasmalogens of humans and rodents. *Lipids*, 27(6), 401–405.
- Dembitsky, V. M. & Vas'kovsky, V. Y. (1976). Quantitative distribution of plasmalogens in different classes of phospholipids in marine invertebrates. *Marine Biology*, 5(4047), 68–72.
- Dembitsky, V. M., Kashin, A. G. & Stefanov, K. (1992). Comparative investigation of phospholipids and fatty acids of freshwater molluscs from the Volga river basin. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 102B(1), 193–198.
- Dembitsky, V. M., Rezanka, T. & Kashin, A. G. (1993). Comparative examination of phospholipids and fatty acids from some caspian invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 104B(3), 617–622.
- Dagorn, F., Couzinet-mossion, A., Kendel, M., Beninger, P. G., Rabesaotra, V., Barnathan, G. & Wielgosz-collin, G. (2016). Exploitable Lipids and Fatty Acids in the Invasive Oyster *Crassostrea gigas* on the French Atlantic Coast. *Marine Drugs*, 14(6), 1–12.
- Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Murphy, R. C., Raetz, C.R.H., Russell, D.W., Meer, G.V., VanNieuwenhze, M.S., White, S.H., Witztum, J.L. & Dennis, E. A. (2005). A comprehensive classification system for lipids. *The Journal of Lipid Research*, 46(5), 839–862.
- Farooqui, A. A., Farooqui, T. & Horrocks, L. A. (2008). *Metabolism and function of bioactive ether lipids in the brain*. (Springer, Ed.). New York: Springer Science + Business.
- Fernández-Reiriz, M. J., Garrido, J. L. & Irisarri, J. (2015). Fatty acid composition in *Mytilus galloprovincialis* organs: trophic interactions, sexual differences and differential anatomical distribution. *Marine Ecology Progress Series*, 528(October), 221–234
- Folch, J., Lees, M. & Stanley, G. H. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226, 497–509.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2010). *Fats and fatty acids in human nutrition*. Roma: FAO.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2016). *The state of world fisheries and aquaculture. Contributions to food security and nutrition for all*. Roma: FAO.
- Fogerty, A. C., Whitfield, F. B., Svoronos, D. & Ford, G. L. (1991). The composition of the fatty acids and aldehydes of the ethanolamine and choline phospholipids of various meats. *International Journal of Food Science & Technology*, 26(4), 363–371.

- Han, X., Holtzman, D. M. & McKeel, D. W. (2001). Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Neurochemistry*, 77(4), 1168–1180.
- Hanuš, L. O., Levitsky, D. O., Shkrob, I. & Dembitsky, V. M. (2009). Plasmalogens, fatty acids and alkyl glyceryl ethers of marine and freshwater clams and mussels. *Food Chemistry*, 116(2), 491–498.
- Hulbert, A. J., Kelly, M. A. & Abbott, S. K. (2014). Polyunsaturated fats, membrane lipids and animal longevity. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 184(2), 149–166.
- Instituto de Investigação das Pescas e do Mar (IPIMAR). (2008). *Produção, salubridade e comercialização dos moluscos bivalves em Portugal*. Publicações Avulsas do IPIMAR (Vol. 20). Lisboa.
- Instituto Nacional de Estatística (2014). *Balança Alimentar Portuguesa - 2008-2012*.
- Instituto Português do Mar e da Atmosfera (2015). *FAQ*. Acedido em nov. 22, 2015, disponível em:
<https://www.ipma.pt/pt/educativa/faq/pescas/index.html?p=2&f=/pt/educativa/faq/pescas/>
- Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA). (2007). *Tabela da composição de alimentos*. Lisboa.
- Kawashima, H. & Ohnishi, M. (2004). Identification of minor fatty acids and various non-methylene-interrupted diene isomers in mantle, muscle, and viscera of the marine bivalve *Megangulus zygonensis*. *Lipids*, 39(3), 265–271.
- Kou, J., Kovacs, G. G., Höftberger, R., Kulik, W., Brodde, A., Forss-Petter, S., Hönigschnabl, S., Gleiss, A., Brügger, B., Wanders, R., Just, W., Budka, H., Jungwirth, S., Fischer, P. & Berger, J. (2011). Peroxisomal alterations in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 122(3), 271–283.
- Kraffe, E., Soudant, P. & Marty, Y. (2004). Fatty acids of serine, ethanolamine, and choline plasmalogens in some marine bivalves. *Lipids*, 39(1), 59–66.
- Koizumi, C., Jeong, B. Y. & Ohshima, T. (1990). Fatty Chain Composition of Ether and Ester Glycerophospholipids in the Japanese Oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Lipids*, 25(7), 363–370.
- Küllenberg, D., Taylor, L. A., Schneider, M. & Massing, U. (2012). Health effects of dietary phospholipids. *Lipids in Health and Disease*, 11(1), 1-16.
- Lessig, J. & Fuchs, B. (2009). Plasmalogens in biological systems: their role in oxidative processes in biological membranes, their contribution to pathological processes and aging and plasmalogen analysis. *Current Medicinal Chemistry*, 16(16), 2021–2041.
- Linehan, L. G., Connor, T. P. O. & Burnell, G. (1999). Seasonal variation in the chemical composition and fatty acid profile of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Food Chemistry*, 64, 211–214.

- Mawatari, S., Yunoki, K., Sugiyama, M. & Fujino, T. (2009). Simultaneous preparation of purified plasmalogens and sphingomyelin in human erythrocytes with phospholipase A1 from *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(12), 2621–2625.
- Mawatari, S., Katafuchi, T., Miake, K. & Fujino, T. (2012). Dietary plasmalogen increases erythrocyte membrane plasmalogen in rats. *Lipids in Health and Disease*, 11(1), 1-7.
- Magnusson, C. D. & Haraldsson, G. G. (2011). Ether lipids. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164(5), 315–340.
- Miller, M. R., Pearce, L. & Bettjeman, B. I. (2014). Detailed Distribution of Lipids in Greenshell™ Mussel (*Perna canaliculus*). *Nutrients*, 6, 1454–1474.
- Mishra, M. K., Kumaraguru, T., Sheelu, G. & Fadnavis, N. W. (2009). Lipase activity of Lecitase® Ultra: characterization and applications in enantioselective reactions. *Tetrahedron Asymmetry*, 20(24), 2854–2860.
- Mozaffarian, D., & Wu, J. H. Y. (2012). (n-3) Fatty Acids and Cardiovascular Health : Are Effects of EPA and DHA Shared or Complementary? *The Journal of Nutrition*, 142, 614S–625S.
- Munro, D. & Blier, P. U. (2012). The extreme longevity of *Arctica islandica* is associated with increased peroxidation resistance in mitochondrial membranes. *Aging Cell*, 11(5), 845–855
- Murphy, K. J., Mooney, B. D., Mann, N. J., Nichols, P. D., & Sinclair, A. J. (2002). Lipid , FA , and Sterol Composition of New Zealand Green Lipped Mussel (*Perna canaliculus*) and Tasmanian Blue Mussel (*Mytilus edulis*). *Lipids*, 37(6), 587-595.
- Nagan, N. & Zoeller, R. A. (2001). Plasmalogens: Biosynthesis and functions. *Progress in Lipid Research*, 40(3), 199–229.
- Nesheim, M. C. & Yaktine, A. L. (2007). *Seafood Choices: Balancing Benefits and Risks*. The National Academies Press. (pp. 67-70). Washington, DC.
- Nishimukai, M., Wakisaka, T. & Hara, H. (2003). Ingestion of plasmalogen markedly increased plasmalogen levels of blood plasma in rats. *Lipids*, 38(12), 1227–1235.
- Nollet, L. M. L. & Toldrá, F. (2010). *Handbook of Seafood and Seafood Product Analysis. Journal of Chemical Information and Modeling*. New York: CRC Press, Taylos & Francis Group.
- Nowak, V., Rittenschober, D., Exler, J. & Charrondiere, U. R. (2014). Proposal on the usage of conversion factors for fatty acids in fish and shellfish. *Food Chemistry*, 153, 457–463.
- Ojea, J., Pazos, A. J., Martinez, D., Novoa, S., Sánchez, J. L., & Abad, M. (2004). Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle. *Aquaculture*, 238, 451–468
- Pérez-Palacios, T., Ruiz, J. & Antequera, T. (2007). Improvement of a solid phase extraction method for separation of animal muscle phospholipid classes. *Food Chemistry*, 102, 875–879.

- Quaresma, M. A. G., Rodrigues, I., Alves, S. P., & Bessa, R. J. B. (2016). Meat lipid profile of suckling goat kids from certified and noncertified production systems. *Small Ruminant Research*, 134, 49–57.
- Rego, O. A., Cabrita, A. R. J., Rosa, H. J. D., Alves, S. P., Duarte, V., Fonseca, A. J. M., Vouzela, C.F.M., Pires, F.R. & Bessa, R. J. B. (2016). Changes in milk production and milk fatty acid composition of cows switched from pasture to a total mixed ration diet and back to pasture. *Italian Journal of Animal Science*, 15(1), 76–86.
- Rosa, H. J. D., Rego, O. A., Silva, C. C. G., Alves, S. P., Alfaia, C. M. M., Prates, J. A. M., & Bessa, R. J. B. (2014). Effect of corn supplementation of grass finishing of Holstein bulls on fatty acid composition of meat lipids. *Journal of Animal Science*, 92(8), 3701–3714.
- Ruano, F., Ramos, P., Quaresma, M., Bandarra, N. M. & Pereira, I. (2012). Evolution of fatty acid profile and Condition Index in mollusc bivalves submitted to different depuration periods Avaliação do perfil de ácidos gordos e do Índice de Condição em moluscos bivalves submetidos a diferentes períodos de depuração. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 107(581-582), 75–84.
- Saito, H. (2008). Unusual novel n-4 polyunsaturated fatty acids in cold-seep mussels (*Bathymodiolus japonicus* and *Bathymodiolus platifrons*), originating from symbiotic methanotrophic bacteria. *Journal of Chromatography. A*, 1200(2), 242–54.
- Schwalbe-Herrmann, M., Willmann, J. & Leibfritz, D. (2010). Separation of phospholipid classes by hydrophilic interaction chromatography detected by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(32), 5179–5183.
- Weihrauch, J. L., Posati, L. P., Anderson, B. A. & Exler, J. (1977). Lipid conversion factors for calculating fatty acid contents of foods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 54(1), 36–40.
- Wood, P. L., Mankidy, R., Ritchie, S., Heath, D., Wood, J. A., Flax, J. & Goodenowe, D. B. (2010). Circulating plasmalogen levels and Alzheimer Disease Assessment Scale-Cognitive scores in Alzheimer patients. *J Psychiatry Neurosci*, 35(1), 59–62.
- Wood, P. L., Smith, T., Lane, N., Khan, M. A., Ehrmantraut, G. & Goodenowe, D. B. (2011). Oral bioavailability of the ether lipid plasmalogen precursor, PPI-1011, in the rabbit: a new therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Lipids in Health and Disease*, 10(1), 1–10.
- Yang, J. G., Wang, Y. H., Yang, B., Mainda, G. & Guo, Y. (2006). Degumming of vegetable oil by a new microbial lipase. *Food Technology and Biotechnology*, 44(1), 101–104.

Anexos

Anexo I: Localização e mês de captura dos bivalves estudados

Nome vulgar	Nome científico	Amostra	Local de captura	Mês de captura
Lambujinha	<i>Scrobicularia plana</i>	Lb 1	Estuário do Sado - Canal de Álcacer	Outubro
		Lb 2	Estuário do Sado - Canal de Álcacer	Fevereiro
		Lb 3	Tejo	Fevereiro
Ameijoa (japonesa)	<i>Ruditapes philippinarum</i>	A 1	Estuário do Sado	Janeiro
		A 2	Lagoa de Óbidos - Foz do Areiro	Fevereiro
		A 3	Ria de Aveiro	Fevereiro
Mexilhão	<i>Mytilus spp.</i>	M 1	Lagoa de Albufeira	Janeiro
		M 2	Sesimbra	Fevereiro
		M 3	Ria de Aveiro	Fevereiro
Ostra	<i>Crassostrea spp.</i>	O 1	Rio Sado - Marateca	Janeiro
		O 2	Ria de Aveiro	Janeiro
		O 3	Lagoa de Óbidos	Fevereiro
Berbigão	<i>Cerastoderma spp.</i>	B 1	Ria de Aveiro	Janeiro
		B 2	Lagoa de Óbidos	Fevereiro
		B 3	Lagoa de Albufeira	Fevereiro
Longueirão	<i>Ensis spp.</i>	Lg 1	Estuário do Sado - Canal de Álcacer	Fevereiro
		Lg 2	Comporta	Fevereiro
		Lg 3	Comporta	Março

Anexo II: Extração de lípidos de amostras liofilizadas

Para determinação do teor em gordura este procedimento é feito em triplicado:

- 2 para gordura total – análise ponderal
- 1 para metilação – análise de ácidos gordos

Reagentes e soluções:

- Metanol;
- Diclorometano;
- Diclorometano:Metanol (2:1) - com a adição de 25 mg/L de BHT;
- Solução cloreto de potássio (0,88%) ou cloreto de sódio (0,73 %) em água;

Preparativos:

Na véspera:

- Colocar os erlenmeyers, com uma pinça, na estufa a 70°C durante 2h (para tarar);
- Pesar a amostra para os tubos de 16 mL que se guarda no frio;
- Dobrar os filtros separadores de fases e os filtros normais;
- Preparar o diclorometano:metanol (2:1);
- Preparar a solução salina de cloreto de potássio ou cloreto de sódio;

No dia:

- Retirar os erlenmeyers para o exsiccador. Após 1 hora pesar (Não tocar com os dedos e não escrever). Colocar de novo os erlenmeyers no exsiccador até serem utilizados.

Procedimento:

1. Pesar 0,200 g de amostra para os tubos de vidro;
2. Adicionar 2 mL de metanol e deixar humedecer durante 5 min;
3. Colocar no banho de ultrassons durante 5 min a 30°C;
4. Adicionar 4 mL de diclorometano, agitar no vortex e colocar no banho de ultrassons durante 10 min a 30°C;
5. Centrifugar para separar a fase sólida (10 min) e retirar o máximo de solvente para outro tubo (de 23 mL), passando por um filtro normal;
6. Adicionar à fase sólida 6 mL de diclorometano:metanol (2:1), agitar no vortex e colocar no banho de ultrassons durante 10 min a 30°C;

7. Centrifugar para separar a fase sólida (5 min) e retirar o máximo de solvente para o tubo do passo 5, passando pelo filtro normal;
8. Adicionar à fase sólida 6 mL de diclorometano:metanol (2:1), agitar no vortex e colocar no banho de ultrassons durante 5 min a 30°C;
9. Centrifugar para separar a fase sólida (5 min) e retirar o máximo de solvente para o tubo do passo 5, passando pelo filtro normal;
10. Adicionar ao filtrado (tubo do passo 5) 3,6 mL de solução de cloreto de potássio 0,88% ou cloreto de sódio 0,73%, agitar no vortex (10 seg) e centrifugar (5 min);
11. Retirar a parte inferior (com pipeta de Pasteur) passando por um filtro separador de fases (que se humedece com diclorometano) para:
 - Tubo de 23 mL – análise de perfil de ácidos gordos
 - Erlenmeyers de 50 mL previamente tarados – análise ponderal
12. Levar os erlenmeyers ao evaporador rotativo a 37°C e o tubo ao evaporador de corrente de azoto a 37°C para posterior transesterificação;
13. Colocar os erlenmeyers na estufa de vácuo a 40°C durante 2 horas. Retirar os erlenmeyers da estufa, colocar no exsiccador e pesar após 1 hora.

Cálculo para determinação do teor lipídico:

$$\frac{mEA \text{ (mg)} - mE \text{ (mg)}}{Toma \text{ (g MS)}} = \text{lípidos totais (mg/g MS)}$$

Em que:

mEA – peso do erlenmeyer + amostra

mE – peso do erlenmeyer

MS – matéria seca

Anexo III: Isolamento de plasmalogénios após hidrólise enzimática com fosfolipase A1

Reagentes e soluções:

Fosfolipase A1(PLA1)

Tampão citrato 0,1M, pH 4,5

Solução tampão PLA1, 10mg/mL

n-hexano:2- propanol (3:2)

Solução aquosa Na₂SO₄ (6,6%)

Sulfato de sódio anidro

Preparativos:

- Colocar os erlenmeyers, com uma pinça, na estufa a 70°C durante 2h (para tarar)
- Retirar os erlenmeyers para o exsicador. Após uma hora pesar (não tocar com os dedos nem escrever). Colocar de novo no exsicador até serem utilizados

Procedimento:

1. Pesar o conteúdo de lípidos, previamente extraídos/separados.
2. Dissolver o extrato lipídico em diclorometano e transferir para tubo de ensaio (16 x 160 mm). Evaporar o solvente em corrente de azoto a 37°C
3. Adicionar 3 mg de PLA1 a cada miligrama de lípidos (30 U/g). Colocar no banho de ultrasons durante 5 min.
4. Incubar a 40°C durante 4h30min, sob agitação (40 rpm)
5. Deixar arrefecer à temperatura ambiente (aprox. 15 min)
6. Adicionar 6 mL hexano:2-propanol (3:2), para extração dos lípidos. Agitar em vortex (10s)
7. Adicionar 4 mL solução Na₂SO₄ (6,6%), para separação de fases. Agitar no vortex (10s) e centrifugar durante 5 min.
8. Retirar a parte superior (hexano) para um novo tubo (16 x 160 mm). Adicionar 2 mL de água. Agitar no vortex (10s) e centrifugar durante 5 min.
9. Transferir a parte superior, orgânica, para um tubo com sulfato de sódio anidro. Agitar no vortex (10s) e centrifugar durante 5 min.
10. Transferir a fase orgânica para um erlenmeyer, previamente tarado.
11. Levar os erlenmeyer's ao evaporador rotativo a 37°C.
12. Colocar os erlenmeyr's na estufa a 40°C durante 2h. Retirar e colocar no exsicador 1h. Pesar.

Anexo IV: Separação de classes lipídicas por cromatografia de extração em fase sólida (SPE)

Reagentes e soluções:

- n-Hexano;
- Diclorometano;
- Metanol;
- Éter dietílico:ác. acético (98:2, v/v)
- Acetonitrilo:iso-propanol (2:1, v/v)
- Iso-propanol:3N HCl 37% em metanol (4:1, v,v)
- Diclorometano:metanol:37% HCl (200:100:1, v,v,v)
- Colunas de SPE, NH₂-aminopropil, 500mg/3 mL ;

Procedimento:

1. Utilizar um sistema de “SPE vacuum manifold”, e equilibrar a coluna de SPE com 4 mL de hexano com o cuidado de não deixar secar a coluna;
2. Dissolver o extracto lipídico (20 mg) em 1 mL de hexano e aplicar na coluna;
3. Eluir com 2 mL de hexano (recolher gota-a-gota para um tubo de ensaio) para recolha dos ÉSTERES DO COLESTROL (EC) – **FRAÇÃO 1**;
4. Colocar um novo tubo e eluir com 5 mL de diclorometano para recolha dos MONO-, DI- e TRIACILGLICEROIS (TAG) – **FRAÇÃO 2**;
5. Colocar um novo tubo e eluir com 5 mL de éter dietílico:ác. acético (98:2, v/v) para recolha dos ÁCIDOS GORDOS LIVRES (AGL) – **FRAÇÃO 3**;
6. Eluir com 32 mL de acetonitrilo:iso-propanol (2:1, v/v) (recolher gota-a-gota para um erlenmeyer), para recolha da FOSFATIDILCOLINA (PC) – **FRAÇÃO 4**;
7. Eluir (para um novo erlenmeyer) com 8 mL de metanol para recolha da FOSFATIDILETANOLAMINA (PE) – **FRAÇÃO 5**;
8. Eluir (para um novo erlenmeyer) com 7,5 mL de iso-propanol:HCl 37% em metanol (4:1, v,v) para recolha da FOSFATIDILSERINA (PS) – **FRAÇÃO 6**;
9. Eluir (para um novo erlenmeyer) com 21,5 mL de diclorometano:metanol:HCl 37% (200:100:1, v,v,v) para recolha da FOSFATIDILINOSITOL (PI) – **FRAÇÃO 7**;
10. Proceder à evaporação do solvente de todas as frações em evaporador rotativo ou em corrente de azoto (no caso dos tubos de ensaio) a 37°C;

11. Dissolver o conteúdo de cada erlenmeyer em tolueno para a metilação (Transesterificação combinada) e transferir para tubos.

Confirmação das separações lípicas por cromatografia em camada fina (TLC):

- *Separação dos lípidos neutros, ácidos gordos livres e lípidos polares por TLC:*

Eluente: hexano/éter/metanol/ac. acético (90:20:5:2, v/v/v/v).

Revelador: vapores de iodo

- *Separação das classes de fosfolípidos (PC, PE, PS e PI):*

Eluente: diclorometano:metanol:25% solução de amónia (65:25:4, v/v/v).

Revelador: vapores de iodo

Anexo V: Transesterificação direta

Reagentes e soluções:

- Tolueno seco;
- n-Hexano com adição de 25 mg/L de BHT;
- n-Hexano para GC;
- Sulfato de sódio anidro;
- Água ultrapura;
- Metóxido de sódio 0,5M em metanol;
- Solução 10% HCl em metanol por adição de cloreto de acetilo em metanol seco
(ATENÇÃO: reação isotérmica, adicionar muito lentamente e com agitação o cloreto de acetilo ao metanol);
- Solução aquosa 6% K_2CO_3 ;
- Padrão interno, éster metílico C19:0 (1 mg/mL em n-Hexano)

Procedimento:

1. Pesar a amostra para tubos (16 x 160 mm) com rolhas de teflon (certificar que vedam bem)

Nota: A quantidade de amostra deve de ser tal modo a conter 10 a 50 mg de ácidos gordos.

2. Adicionar 1 mL de tolueno seco e 1 mL de padrão interno (1 mg/mL) e colocar no ultrassons durante 10 min;
3. Adicionar 2 mL de solução metóxido de sódio em metanol 0,5 M e levar ao vortex (10 seg);
4. Colocar no banho de água a 50°C durante 10 min sob agitação (40rpm);
5. Deixar arrefecer à temperatura ambiente (aprox. 15 min);
6. Adicionar 3 mL de solução HCl/metanol e agitar em vortex (10 seg);
7. Colocar num banho de água a 80°C durante 10 min sob agitação (40 rpm), e deixar arrefecer à temperatura ambiente (aprox. 15-20 min);
8. Adicionar 2 mL da solução 6% K_2CO_3 e 2 mL de n-Hexano, agitar em vortex (10 seg) e centrifugar durante 5 min;
9. Transferir a fase orgânica superior para um novo tubo (16 x 160 mm) que já contém 0,5 g de sulfato de sódio anidro;
10. Adicionar novamente ao resíduo do passo 9, 2 mL de n-Hexano, agitar em vortex (10 seg) e centrifugar durante 5 min;
11. Recolher a fase orgânica superior para o mesmo tubo do passo 9;

12. Agitar o tubo com o sulfato de sódio anidro em vortex (10 seg) e centrifugar durante 5 min;
13. Retirar a fase de hexano que contém os ésteres metílicos para um novo tubo (16 x 100 mm) e evaporar em corrente de azoto a 37°C;
14. Adicionar 1 mL de n-Hexano, agitar e transferir para um vial de GC.

Anexo VI: Composição lipídica dos bivalves

	Lambujinha	Ameijoia	Ostra	Mexilhão	Berbigão	Longueirão
Lípidos totais, g/100g alimento	3,9 ± 0,56	3,2 ± 0,35	5,6 ± 1,12	5,9 ± 1,04	3,8 ± 0,61	3,1 ± 0,72
Lípidos neutros, % lípidos totais	69,6 ± 12,28	50,5 ± 3,31	80,2 ± 3,45	73,9 ± 13,85	43,1 ± 8,57	58,5 ± 14,70
Fosfolípidos, % lípidos totais	30,4 ± 12,28	49,5 ± 3,31	19,8 ± 3,45	26,1 ± 13,85	56,9 ± 8,57	41,5 ± 14,70
Ésteres de colesterol, % lípidos neutros	18,1 ± 7,59	70,2 ± 4,82	12,0 ± 6,54	14,4 ± 6,28	47,1 ± 22,01	31,9 ± 30,29
Triacilgliceróis, % lípidos neutros	68,7 ± 2,78	16,6 ± 5,88	80,8 ± 8,31	75,5 ± 5,20	16,0 ± 8,50	44,5 ± 29,95
Ácidos gordos livres, % lípidos neutros	13,2 ± 6,62	13,2 ± 1,37	7,2 ± 2,30	10,1 ± 1,79	36,9 ± 22,72	23,6 ± 3,49
PC, % fosfolípidos	16,3 ± 4,25	18,5 ± 4,51	11,3 ± 1,97	15,5 ± 2,45	15,4 ± 6,36	13,8 ± 6,20
<i>PC_{plsm}, % PC</i>	29,7 ± 15,83	39,7 ± 19,82	36,4 ± 13,44	21,2 ± 9,39	17,3 ± 10,21	15,4 ± 4,34
<i>PC_{diacil}, % PC</i>	70,3 ± 15,83	60,3 ± 19,82	63,6 ± 13,44	78,8 ± 9,39	82,7 ± 10,21	84,6 ± 4,34
PE, % fosfolípidos	54,5 ± 10,40	48,2 ± 7,25	54,6 ± 2,33	51,7 ± 7,42	62,8 ± 1,85	61,5 ± 11,77
<i>PE_{plsm}, % PC</i>	11,3 ± 6,41	14,6 ± 9,04	11,9 ± 9,85	14,6 ± 9,04	15,1 ± 3,52	12,4 ± 6,38
<i>PE_{diacil}, % PC</i>	88,7 ± 6,41	85,4 ± 9,04	88,1 ± 9,85	85,4 ± 9,04	84,9 ± 3,52	87,6 ± 6,38
PS, % fosfolípidos	26,0 ± 4,56	29,0 ± 5,20	26,7 ± 7,25	21,4 ± 6,53	17,5 ± 4,45	22,2 ± 4,87
<i>PS_{plsm}, % PC</i>	30,6 ± 8,29	18,4 ± 6,76	31,1 ± 12,05	44,7 ± 25,10	27,4 ± 18,85	25,3 ± 8,45
<i>PS_{diacil}, % PC</i>	69,4 ± 8,29	81,6 ± 6,76	68,9 ± 12,05	55,3 ± 25,10	72,6 ± 18,85	74,7 ± 8,45
PI, % fosfolípidos	3,3 ± 1,77	4,3 ± 1,52	7,5 ± 3,01	11,3 ± 13,61	4,3 ± 2,51	2,6 ± 1,16

Abreviaturas: PC – fosfolípidos de colina; PC_{plsm} – plasmenilcolina; PC_{diacil} – fosfatidilcolina; PE – fosfolípidos de etanolamina; PE_{plsm} – plasmeniletanolamina; PC_{diacil} – fosfatidiletanolamina; PS – fosfolípidos de serina; PS_{plsm} – plasmenilserina; PS_{diacil} – fosfatidilserina; PI – fosfolípidos de inositol